

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI FISIOPATOLOGIA CLINICA

Scuola di Dottorato di Ricerca in
**SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE E
METABOLICHE**

Dottorato di Ricerca in
SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE E METABOLICHE
XXI CICLO

Settore disciplinare MED/13

Potenzialità rigenerative dei progenitori embrionali renali
multipotenti CD24+CD133+ in un modello di insufficienza
renale acuta

TUTOR

Prof.ssa Paola Romagnani

Tesi di

Dott.ssa Costanza Sagrinati

COORDINATORE

Prof. Gianni Forti

Triennio 2006-2008

Alla mia famiglia

INDICE

RIASSUNTO	pag.1
INTRODUZIONE	pag.3
CARATTERISTICHE DELLE CELLULE STAMINALI	pag.6
TIPI DI CELLULE STAMINALI	pag.9
EMBRIOGENESI DELRENE	pag.14
CELLULE STAMINALI RENALI	pag.26
L' INSUFFICIENZA RENALE ACUTA	pag.38
MATERIALI E METODI	pag.49
Anticorpi	pag.49
Tessuti	pag.50
Isolamento e coltura delle cellule embrionali CD24+CD133+	pag.50
Colture Cellulari	pag.52
Microscopia Confocale	pag.52
Real-Time Quantitative RT-PCR	pag.53
Citometria a Flusso	pag.53
Immunistoichimica	pag. 54
Differenziazione <i>in vitro</i>	pag.55
Colorazioni Istochimiche	pag.56
Differenziazione <i>in vivo</i>	pag.57
Topi	pag.57
Xenotrapianto in un modello di necrosi tubulare acuta indotta da glicerolo in topi	
SCID	pag.57
Morfologia Renale	pag.60
Valutazione della tumorigenicità	pag.61
Analisi Statistica	pag.61
RISULTATI	pag.62
I reni embrionali umani contengono un alto numero di cellule CD24+CD133+ selettivamente localizzate nel mesenchima metanefrico, che progressivamente diminuiscono nel corso del differenziamento del rene	pag.62
Le CD24+CD133+REC mostrano gli stessi markers fenotipici delle APEMP e manifestano sia capacità di autorinnovamento che di multi differenziamento	pag.68
Le CD24+CD133+REC differenziano in diversi tipi di cellule residenti renali in topi SCID affetti da Insufficienza Renale Acuta	pag.79
Le CD24+CD133+REC inducono un completo recupero della funzione e della morfologia renale	pag.83
Le CD24+CD133+REC prevengono l'insorgenza di ARF severa attraverso un incremento dei processi riparativi	pag.88
Le CD24+CD133+REC non hanno la capacità di formare tumori in vivo	pag.89
DISCUSSIONE	pag.92
BIBLIOGRAFIA	pag.96

RIASSUNTO

Nel corso degli ultimi anni diversi lavori hanno valutato il possibile ruolo delle cellule staminali e delle cellule progenitrici derivate sia dal midollo osseo che dal rene adulto per lo sviluppo di terapie cellulari per la cura dell'insufficienza renale. In questo lavoro descriviamo l'identificazione e la caratterizzazione di una popolazione di cellule progenitrici renali multipotenti in reni umani embrionali. Queste cellule condividono con i progenitori renali adulti l'espressione dei marcatori di superficie CD24 e CD133 e mostrano capacità di auto-rinnovamento e di differenziamento *multilineage*. Un'analisi approfondita della loro distribuzione durante lo sviluppo del rene embrionale ha dimostrato che le cellule CD24+CD133+ nei reni embrionali (*renal embryonic cells* o REC) popolano le strutture primordiali del nefrone, ma progressivamente diminuiscono durante la nefrogenesi fino a costituire nel rene adulto una piccola sottopopolazione selettivamente localizzata al polo urinifero della capsula di Bowman. Se recuperate e inoculate in topi SCID affetti da insufficienza renale acuta, queste cellule sono in grado di rigenerare differenti segmenti del nefrone, di ridurre la necrosi tissutale e la fibrosi tubulointerstiziale residua e di migliorare la funzione renale, senza mostrare alcun potenziale tumorigenico *in vivo*.

Queste osservazioni suggeriscono che le cellule CD24+CD133+ rappresentino una sottopopolazione di progenitori embrionali multipotenti presenti nel rene umano fin dagli stadi più precoci della nefrogenesi. Inoltre, la capacità delle

cellule embrionali CD24+CD133+REC di riparare il danno renale, insieme con la loro apparente impossibilità a formare tumori, avvalorano l'ipotesi di una loro effettiva potenzialità per il trattamento dell'insufficienza renale.

Parole Chiave:

Cellule Staminali, Insufficienza Renale, Genetica e Sviluppo del Rene, Fibrosi Renale.

INTRODUZIONE

L'insufficienza renale cronica (Chronic Kidney Disease, CKD) è una delle principali cause di mortalità e morbidità nei paesi occidentali, ed è stimato che affligga l'11% della popolazione adulta¹. Essa può progredire verso l'insufficienza renale terminale (End-Stage Renal Disease, ESRD), che ad oggi non può essere curata, se non ricorrendo a terapie renali sostitutive che si realizzano nella dialisi extracorporea o nel trapianto di rene. Il numero di pazienti con ESRD sta aumentando in maniera consistente, con parallelo aumento dei costi, che superano la spesa investita per il trattamento dei tumori¹. Grazie agli studi svolti fino ad oggi, si può ipotizzare che negli stadi precoci di CKD, quando sono ancora mantenute una funzione residua e l'istologia dell'organo, sia possibile ottenere una riparazione del danno attraverso l'impiego di terapie cellulari. Le cellule staminali (SC), capaci di auto-rinnovarsi e di prendere parte al mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale dei tessuti, sono particolarmente indicate a tale scopo. Anche l'insufficienza renale acuta (IRA) è una delle principali cause di mortalità e morbidità². Quindi, la rigenerazione renale basata sulle SC può essere critica per ridurre l'incidenza e la severità dell'IRA. Lo sviluppo di terapie con SC per il rene è nella sua fase iniziale, soprattutto a causa della complessità di quest'organo^{3,4}. La caratteristica fondamentale delle SC è di essere capaci di generare molti o tutti i tipi cellulari facenti parte di un organo. Nel

rene vi sono almeno 26 tipi cellulari differenziati terminalmente, tutti distinguibili per morfologia, localizzazione e funzione. Quindi, per poter rigenerare il danno renale, è fondamentale l'impiego di cellule che siano in grado di differenziare nei vari tipi cellulari renali.

Recentemente, nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato l'esistenza di una popolazione di progenitori multipotenti residenti nel rene adulto. Queste cellule rappresentano una sottopopolazione di cellule epiteliali parietali localizzate a livello del polo urinifero della capsula di Bowman che noi abbiamo denominato APEMP (adult parietal epithelial multipotent progenitors - progenitori multipotenti epiteliali parietali adulti). Le cellule APEMP iniettate nel topo SCID, a cui è stato precedentemente indotto un danno da insufficienza renale acuta, sono in grado di rigenerare differenti porzioni del nefrone, migliorare i livelli di azotemia e ridurre significativamente la fibrosi dell'organo⁵.

La possibilità di utilizzare le cellule staminali embrionali per il trattamento del danno renale rappresenta un'altra stimolante alternativa, che tuttavia ci pone di fronte a diversi problemi di tipo applicativo. Infatti, pur essendo già stata dimostrata l'efficienza delle cellule derivanti dalla blastocisti^{3,6}, il loro utilizzo è limitato a causa della possibilità che si sviluppino teratomi^{3,7,8}. Inoltre, le cellule staminali embrionali devono essere differenziate *in vitro* in specifiche linee cellulari prima di essere trapiantate, e questo processo potrebbe non garantire l'assenza di una contaminante costituita da cellule indifferenziate tumorigeniche^{3,6,8}.

La risorsa ideale di cellule, da poter utilizzare per la riparazione del rene, potrebbe essere rappresentata da cellule staminali e/o progenitori fetali organo-specifici

capaci di generare direttamente i diversi tipi cellulari dell'organo, ovviando così alla necessità di differenziare in vitro le cellule da trapiantare.

CARATTERISTICHE DELLE CELLULE STAMINALI

Per essere definita tale, una cellula staminale deve avere delle caratteristiche funzionali critiche. In primo luogo deve possedere la capacità di AUTO-MANTENIMENTO⁹⁻¹¹ o auto-rinnovamento, ovvero deve essere capace di perpetuare sé stessa indefinitamente, sostenendo anche più di 160 divisioni cellulari senza andare incontro a trasformazione neoplastica¹⁰. In altre parole, le SC devono essere capaci di compiere delle divisioni simmetriche, creando così cellule figlie identiche a sé stesse, aventi lo scopo di autorinnovarsi⁹⁻¹¹. In ciascun organismo, l'elevata capacità proliferativa di un pool di cellule staminali è fondamentale per il mantenimento degli organi.

In secondo luogo, la cellula staminale deve mostrare un POTENZIALE MULTIDIFFERENZIATIVO, ossia deve essere in grado di differenziarsi in numerosi tipi cellulari⁹⁻¹². Ciò avviene mediante divisione asimmetrica, ovvero attraverso la generazione di due cellule figlie, di cui una identica alla cellula madre e l'altra destinata a proliferare e poi differenziare, perdendo la capacità di autorinnovamento. Per differenziamento s'intende l'acquisizione, in seguito ad opportuni stimoli, di caratteristiche morfologiche, fenotipiche e funzionali che appartengono ad un tipo cellulare specifico; pertanto, durante il differenziamento, mentre alcuni geni si attivano, altri vengono inattivati affinché la cellula indifferenziata si specializzi.

Sulla base delle potenzialità differenziative, è possibile distinguere le cellule staminali in^{10,12}:

- cellule staminali totipotenti: in grado da sole di sviluppare un intero organismo, perché capaci di generare tutte le cellule e i tessuti che costituiscono l'embrione, supportandone la crescita in utero;
- cellule staminali pluripotenti: che non possono generare un organismo completo, ma che sono in grado di specializzarsi in cellule appartenenti ad ognuno dei tre foglietti germinali;
- cellule staminali multipotenti: capaci di differenziare in un numero limitato di tipi cellulari.
- cellule unipotenti: definite più correttamente cellule progenitrici piuttosto che staminali, capaci, cioè, di differenziare in un unico tipo cellulare.

La terza proprietà distintiva della cellula staminale è la CLONOGENICITA'⁹⁻¹¹, ossia la capacità di moltiplicarsi e di dare origine ad una progenie di cellule con caratteristiche identiche alla cellula staminale parentale.

Per definire la cellula staminale da un punto di vista molecolare è opportuno chiarire il concetto di “staminalità”^{9,13}. Con questo termine si vuol indicare quel comune background molecolare che controlla le proprietà di tutte le cellule staminali. Infatti, nonostante le cellule staminali debbano far fronte alle diverse richieste dei vari microambienti di appartenenza, si ritiene che esse condividano specifiche caratteristiche genetiche. A tal proposito, lo studio del profilo trascrizionale¹³ delle cellule staminali ha fornito recentemente delle conferme interessanti. In primo luogo, le cellule staminali sono in grado di dialogare tramite un'ampia gamma di fattori di crescita e di molecole di superficie come ligandi, recettori e molecole di adesione. Ad esempio, le molecole TGF β (transforming growth factor- β), Notch e Wnt regolano la capacità di autorinnovamento delle SC

attivando vie specifiche di trasduzione del segnale. Inoltre, le cellule staminali esprimono molti fattori coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare come, ad esempio, quelli responsabili del prolungamento e dell'arresto in G1 (caratteristico delle cellule staminali adulte quiescenti). Le SC condividono anche l'espressione di geni di "staminalità" come, ad esempio, Nanog e Oct-4, scoperti per la prima volta nelle cellule staminali embrionali e successivamente individuati anche nelle cellule staminali adulte. Oct-4 è coinvolto nel mantenimento del self-renewal, mentre Nanog è essenziale nel mantenimento del fenotipo pluripotente sia *in vivo* che *in vitro*. L'espressione di Nanog non è regolata da Oct-4, ma le due proteine collaborano al fine di garantire un fenotipo staminale: infatti, i loro livelli di espressione influenzano fortemente il fenotipo cellulare.

Le cellule staminali, inoltre, possiedono la capacità di riparazione attiva del DNA e di resistenza all'apoptosi e presentano generalmente livelli piuttosto elevati dell'enzima telomerasi, che attraverso il mantenimento della lunghezza dei telomeri, consente il continuo proliferare della cellula. Infine, i diversi tipi di SC condividono alcune modalità di risposta allo stress. In seguito all'esposizione a vari agenti citotossici, è stato dimostrato che le cellule staminali incrementano la trascrizione di proteine transmembrana responsabili della multiresistenza ai farmaci (multidrug resistance transporters), dell'ubiquitina, delle proteine anti-apoptotiche e di molti enzimi appartenenti ai sistemi di detossificazione.

TIPI DI CELLULE STAMINALI

Sulla base della loro provenienza, le cellule staminali possono essere distinte in due categorie⁹⁻¹¹: le cellule staminali embrionali (ESC, Embryonal Stem Cells) e le cellule staminali adulte (ASC, Adult Stem Cells).

Le CELLULE STAMINALI EMBRIONALI derivano dalla massa cellulare interna (Inner Cell Mass o ICM) della blastocisti (stadio embrionale al 4°-5° giorno dopo la formazione dello zigote). Queste cellule possono essere prelevate in un preciso e limitato periodo di vita embrionale che va dal 4° al 6° giorno, prima dell'impianto dell'embrione in utero^{10,14}. Le ESC, pur non essendo in grado di generare un individuo intero, possiedono le tre caratteristiche principali che contraddistinguono le cellule staminali: la capacità di automantenersi, la clonogenicità e la capacità di differenziare nei molteplici tipi cellulari specializzati che formano l'individuo. Oltre a queste caratteristiche, le ESC sono capaci di proliferare in modo illimitato in coltura mantenendo uno stato indifferenziato ed un cariotipo diploide normale.

Utilizzando un modello sperimentale murino, è stato possibile mettere in risalto la capacità delle ESC, di contribuire alla formazione di tutte le linee somatiche e germinali. Infatti, le ESC murine, se inoculate all'interno di una nuova blastocisti, vengono integrate in tutti e tre i foglietti embrionali incluse le cellule germinali, dando origine ad animali chimerici. Una prova indiretta di questa capacità multidifferenziativa, è data dal fatto che numerose linee di ESC sono in grado di formare teratomi se inoculate nel topo immunodeficiente¹⁵. I teratomi sono tumori costituiti da tipi cellulari derivati dai tre foglietti embrionali e l'insorgenza di questo particolare tipo di neoplasia dimostra la pluripotenza delle ESC.

Ad ulteriore conferma delle loro potenzialità differenziative, le ESC, se coltivate in sospensione, differenziano spontaneamente dando origine ai corpi embrioidi. Queste strutture presentano al loro interno cellule appartenenti ai tre foglietti germinali.

Da un punto di vista più strettamente molecolare, le ESC esprimono alti livelli di Nanog e Oct-4, fattori trascrizionali responsabili rispettivamente del mantenimento della pluripotenza e della capacità di auto-mantenimento. Inoltre, non mostrano inattivazione del cromosoma X, mancano del check-point della fase G1 e, quindi, rimangono nella fase S del ciclo cellulare per la maggior parte della loro vita. Infine, a differenza delle cellule somatiche differenziate, non richiedono stimoli esogeni per iniziare la replicazione.

Dopo l'isolamento dalla blastocisti, le cellule staminali embrionali murine possono essere coltivate *in vitro* e mantenute in uno stato indifferenziato mediante coltura su un feeder di fibroblasti murini inattivati o, in alternativa, in un medium contenente LIF (leucemia inhibiting factor). La coltura di cellule staminali embrionali umane, invece, prevede l'utilizzo di un feeder di cellule umane o, in alternativa, il mantenimento in condizioni feeder free, in presenza di matrigel, laminina o fibronectina, con aggiunta di un medium condizionato proveniente da un feeder di cellule umane.

Esistono anche altre cellule staminali ottenibili dall'embrione. Allo stadio di blastocisti, oltre alle cellule delle ICM, una distinta popolazione di cellule staminali embrionali si identifica a livello del trofoblasto ed è per questo denominata trofoblastica. Le ESC trofoblastiche coltivate *in vitro* sono in grado di

differenziare in tutte le linee cellulari del trofoectoderma, comprese le cellule giganti del sinciziotrofoblasto¹⁶.

Un'altra popolazione di cellule staminali pluripotenti è stata identificata nell'embrione murino allo stadio di gastrula, una fase embrionale successiva a quella di blastocisti. Queste cellule, riconosciute come cellule germinali primordiali (PGC, Primordial Germ Cells)^{14,17} e identificate accanto all'epiblasto, evitano la successiva differenziazione somatica per migrare e colonizzare la cresta genitale, dove daranno luogo alle cellule germinali mature. Le PGC, una volta isolate e messe in coltura, danno origine ad una popolazione di cellule multipotenti, chiamate cellule germinali embrionali (EGC, Embryonal Germ Cells)¹⁷, che hanno dimostrato un comportamento analogo a quello delle cellule staminali embrionali, sia negli esperimenti *in vitro* che *in vivo*^{17,18}. Tuttavia, le EGC differiscono dalle ESC per le loro diverse caratteristiche di crescita *in vitro*. ESC umane sono state propagate per circa due anni *in vitro*, per diverse centinaia di population doublings, mentre le cellule germinali embrionali sono state finora mantenute solo per 70-80 population doublings. Inoltre, le EGC differiscono dalle ESC in quanto caratterizzate da una minore capacità di formare teratomi *in vivo* e di produrre animali chimerici, probabilmente dovuta alla comparsa più tardiva durante l'ontogenesi¹⁷.

Le CELLULE STAMINALI ADULTE (ASC, Adult Stem Cells) sono cellule indifferenziate che si localizzano nei tessuti specializzati dell'adulto. Queste cellule possiedono solo in parte le caratteristiche morfologiche, strutturali, molecolari o antigeniche che si riscontrano nelle cellule differenziate del loro tessuto di appartenenza; inoltre, presentano le caratteristiche tipiche delle cellule

staminali, quali la clonogenicità e la capacità di automantenersi indefinitamente¹⁹. Esse svolgono due funzioni primarie: il mantenimento dell'omeostasi del tessuto e la sostituzione delle cellule morte che avviene in seguito ad una patologia o a un danno tissutale. A differenza delle ESC, non è ancora chiaro in quale fase dello sviluppo embrionale abbiano origine le cellule staminali adulte. Secondo alcuni autori, le ASC si sviluppano dopo la gastrulazione, pertanto il loro potenziale differenziativo è limitato soltanto al foglietto embrionale di origine. Questa teoria sembra essere la più accreditata, benché altri autori ritengano che lo sviluppo delle ASC si verifichi prima della gastrulazione.

Le ASC in ogni organo risiederebbero in nicchie specifiche, ovvero in regioni privilegiate dei tessuti di appartenenza, dove sarebbero protette da insulti ambientali e riceverebbero un adeguato apporto ematico. La nicchia consente l'interazione tra le cellule staminali e le altre cellule di supporto, necessarie a produrre fattori utili per prevenirne l'ingresso nel ciclo cellulare. Quindi, la nicchia opera un meccanismo di controllo dell'autorinnovamento e del differenziamento delle SC. Nicchie staminali, ad oggi ampiamente studiate, sono state ritrovate a livello del midollo osseo, dei tubuli seminiferi, del follicolo pilifero e nelle cripte dell'epitelio intestinale²⁰.

Strettamente legata alla capacità di automantenimento è la capacità di differenziare in risposta ad opportuni stimoli. Le cellule staminali adulte sono capaci di dare origine a tutti i tipi cellulari del tessuto a cui appartengono, contribuendo così al mantenimento dell'omeostasi ed all'integrità strutturale e funzionale dell'organo, mediante la sostituzione delle cellule mature danneggiate o morte¹⁹. Queste due proprietà esclusive delle cellule staminali si realizzano

attraverso due distinti meccanismi proliferativi²¹. Il primo si basa su una divisione asimmetrica, nella quale si generano, ad ogni ciclo cellulare, una cellula identica alla cellula madre (staminale) e una più differenziata, che è destinata a originare una cellula matura dopo un numero limitato di cicli cellulari, e che è definita cellula di transizione o precursore transitorio di amplificazione. Il secondo meccanismo proliferativo, invece, prevede una divisione di tipo simmetrico. Questo secondo meccanismo è più flessibile perché, secondo le necessità omeostatiche dell'organo, può favorire cicli proliferativi di espansione (da una cellula madre a due cellule figlie identiche alla cellula che le ha generate) oppure cicli differenziativi (da una cellula madre a due cellule figlie più differenziate). Sebbene le cellule staminali adulte e quelle embrionali condividano molte caratteristiche, le ASC sono più rare e molto più difficili da identificare, isolare e purificare. Il loro numero, infatti, declina progressivamente con lo sviluppo dell'organismo e raggiunge valori minimi e stabili in età adulta.

EMBRIOGENESI DEL RENE

Il rene dei mammiferi si sviluppa in tre momenti successivi ciascuno dei quali è caratterizzato dalla presenza di un abbozzo renale che poi degenera per lasciare il posto al successivo. Ognuna di queste ondate deriva dal mesoderma intermedio e dà luogo rispettivamente al PRONEFRO, senza funzione apparente, al MESONEFRO, che serve come organo escretorio durante l'embriogenesi e al METANEFRO, che rappresenta il rene permanente dell'organismo adulto.

La prima indicazione morfologica di una derivazione unica dal mesoderma intermedio è la formazione del dotto nefritico primario²² (detto anche Dotto di Wolff), evento che, nell'uomo, si realizza al giorno dell'embriogenesi E22²³.

Questo tubo epiteliale formato da singole cellule spesse si estende, con meccanismo bilaterale, caudalmente, fino a quando non raggiunge la cloaca²², inducendo il mesoderma adiacente a differenziarsi nei due organi transienti, detti pronefro e mesonefro²³. Infatti, mentre il dotto nefritico primario si accresce, un apparato lineare di tubuli epiteliali si forma e si estende medio-ventralmente verso l'aorta dorsale. Questi tubuli derivano dalle cellule mesenchimali adiacenti al dotto di Wolff e assieme costituiscono la regione conosciuta come corda nefritica. A questo punto, i tubuli posti più anteriormente, molto rudimentali, sono nominati pronefrici, mentre i tubuli posti più caudalmente, ben sviluppati, con glomeruli e strutture simili a tubuli convoluti prossimali, sono detti mesonefrici.

I tubuli mesonefrici sono unità filtranti transienti, che degenerano al momento che il rene adulto, o metanefro, prende forma²². Infatti, sia il pronefro che il mesonefro, regrediscono entro 2-4 giorni dalla loro formazione, andando incontro ad apoptosi²³.

Il dotto di Wolff continua ad estendersi caudalmente e induce un accrescimento epiteliale, intorno al giorno dell'embriogenesi E28, chiamato bozza o gemma ureterale (*Ureteric bud*, UB), che invade l'adiacente mesenchima metanefrico (MM), detto anche blastema metanefrico, una regione di cellule morfologicamente distinte dal circostante mesoderma (Figura 1).

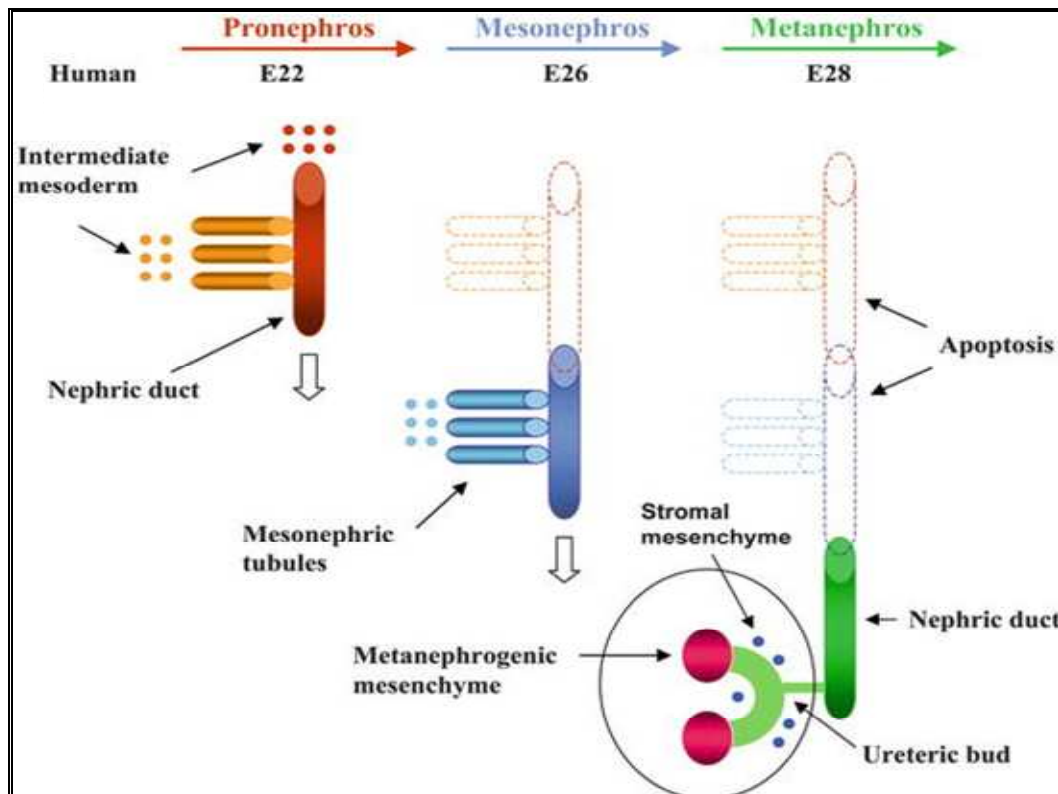


Figura 1. Rappresentazione schematica dello sviluppo del rene. Modificata da Yosipiv IV and Dahr SS, *Pediatr Nephrol*, 20, 1219-1229, 2005.

Questi eventi, danno inizio, alla formazione del metanefro.

Nell'uomo, lo sviluppo a rene maturo si realizza a partire dalla quinta settimana di gestazione²⁴, grazie ad interazioni mutualmente induttive fra la UB e il MM. I segnali provenienti dal MM inducono la UB ad allungarsi, invadere il mesenchima circostante e ramificarsi ripetutamente. Il processo di reciproca induzione procede in maniera centrifuga con un gradiente di maturazione che aumenta verso la periferia.

Le prime 6-8 ramificazioni della UB andranno a formare i calici renali, la pelvi, l'uretere e il trigono della vescica, mentre le generazioni successive formeranno i dotti collettori. Contemporaneamente, in seguito alla realizzazione dei primi punti di ramificazione, in corrispondenza di quest'ultimi, alcune cellule mesenchimali si aggregano e condensano dando inizio al processo di conversione da mesenchima ad epitelio, processo noto come transizione mesenchima-epitelio (MET, *Mesenchyme to Epithelium Transdifferenzation*)^{25,26}, che porterà alla formazione dei glomeruli, dei tubuli distali e prossimali e delle anse di Henle, cioè i nefroni²⁴, mentre altre cellule mesenchimali genereranno lo stroma interstiziale. Gli aggregati da prima formano una vescicola renale polarizzata, un'estremità della quale mantiene il contatto con l'epitelio della UB. Una singola invaginazione si forma nella vescicola per generare la struttura conosciuta come "corpo a forma di virgola", in seguito da una seconda introflessione si genera il "corpo a forma di esse". A questo stadio il corpo a forma di esse è ancora modellato lungo l'asse prossimale-distale. L'estremità distale che era rimasta in contatto con l'epitelio della UB è adesso fusa a formare un singolo continuo tubulo epiteliale. L'estremità prossimale forma la matassa glomerulare, mentre le cellule endoteliali invadono l'introflessione più prossimale (Figura 2A). L'interazione fra le cellule endoteliali e le cellule epiteliali glomerulari derivate dal mesenchima, conduce alla formazione della membrana glomerulare basale, una matrice altamente specializzata che costituisce la struttura per la barriera di filtrazione.

La UB continua a ramificarsi e spinge i nuovi nefroni lungo l'asse radiale del rene, in modo che i nefroni che si formano per primi, si localizzano più vicino alla

zona midollare, mentre quelli che si formano per ultimi, si localizzano nella zona nefrogenica più periferica²².

Durante lo sviluppo si succedono, a partire dalla UB, ramificazioni ripetute per circa 15 volte, che normalmente portano alla generazione di un numero di nefroni compresi fra 300000 e 1 milione per ogni rene umano²⁷.

La formazione dei rami laterali è seguita da una terminazione bifida (la biforcazione di un ramo in due rami figli). Al momento che ogni UB si connette al nefrone, quella ramificazione viene rimossa dai successivi eventi di ramificazione. Questo meccanismo di ramificazione induce la maggior parte dei nefroni che si formano inizialmente. La restante parte si sviluppa attraverso il processo, poco compreso fino ad oggi, della formazione di arcate, e durante la fase tardiva di ramificazione²⁸. La formazione dei calici renali e della pelvi- la parte del sistema collettore renale che conduce all'uretere- si realizza attraverso la crescita e la dilatazione dei segmenti ramificati precoci (Figura 2B). Esiste una grande variabilità nel numero di nefroni per rene fra le varie specie animali, e al momento non si sa se si realizzino fra le differenti specie gli stessi meccanismi di ramificazione²⁹.

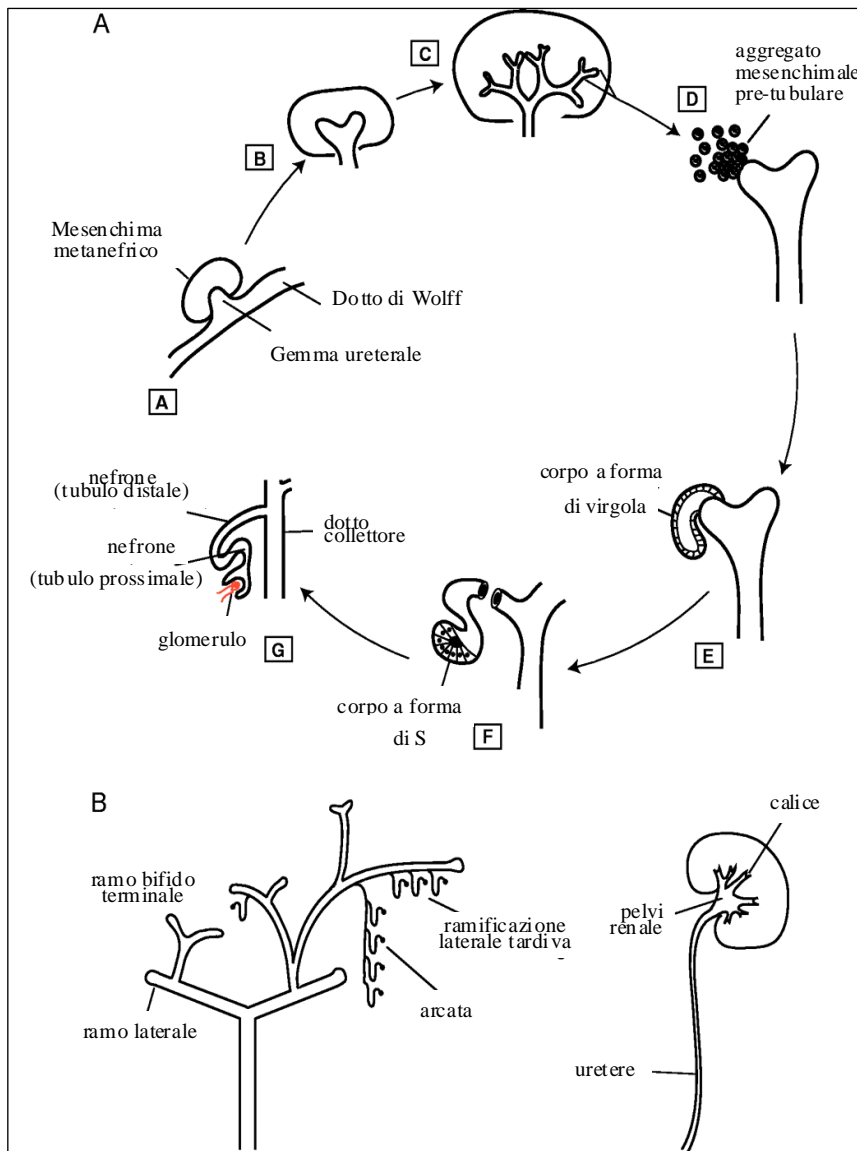


Figura 2:
Stadi della
ramificazione
morfogenica
renale e della
formazione del
nefrone .

A (A) La crescita della UB a partire dal dotto di Wolff è indotta da segnali provenienti dal MM.

(B,C) L'invasione del MM da parte della UB è seguita da ramificazioni concatenate fra la UB e l'allungamento degli abbozzi della UB.

(D) Sulla cima dei rami, l'epitelio induce il mesenchima a formare aggregati pretubulari, che percorreranno vari stadi attraverso la transizione mesenchima-epitelio, quali lo stadio di corpo a forma di virgola (E), corpo a forma di S (F) e la formazione delle componenti del nefrone (G): i tubuli renali

(prossimali e distali) e l'epitelio glomerulare.

B: La formazione del nefrone si pensa che sia determinata principalmente grazie alla ramificazione della UB (a sinistra). La UB utilizza un meccanismo di ramificazione laterale seguito da una biforcazione del picciolo in due rami figli (ramificazione terminale bifida) per formare il sistema collettore renale. I nefroni vengono indotti a partire dalle cime delle UB, ma sono formati anche attorno alle cime dei rami che si allungano durante le successive ramificazioni ripetute e durante la fase tardiva delle ramificazioni laterali. (a destra). I segmenti del sistema collettore vicino all'uretere (pelvi renale e calice) sono formati a partire dai rami precoci che si dilatano della UB.

Modificata da Shah MM, *Development* 131, 1449-1462, 2004.

L'origine dei nefroni dal MM e non dalla UB, come diretta conseguenza della sua diramazione, è stata dimostrata da un esperimento di Grobstein³⁰, che prelevò il blastema, rappresentato dall'aggregato cellulare condensato attorno alla UB, e lo pose in coltura. In vitro, il blastema metanefrico formò strutture tubulari nefritiche in presenza di tessuti embrionali che, se pur diversi dalla UB, risultarono in grado di comportarsi da induttori della tubulogenesi. Tra questi tessuti, il tessuto nervoso del midollo spinale primordiale risultò il più efficace in tal senso.

Gruenwald³¹, invece, si occupò del processo di induzione, e in particolare, quello diretto dall'UB al tessuto nefrogenico. Nell'embrione di pollo, che non dispone di un vero e proprio UB, poiché provvisto solo di pro- e mesonefro, il dotto mesonefrico, ad un certo punto della sua crescita longitudinale assiale, viene bloccato. Le cellule del dotto mesonefrico aggirano l'ostacolo, by-passano la maggior parte del tessuto nefrogenico (lo sviluppo del quale precede in senso caudale a quello del dotto), e prendono contatto con l'ultimissima parte dell'aggregato mesenchimale nefrogenico nell'ambito del mesoderma intermedio. Questa area caudale, se l'embrione fosse dotato di UB, corrisponderebbe all'area del blastema metanefrico, ma il contatto con il dotto mesonefrico o con tessuto nervoso posto nelle immediate vicinanze, determina la sua differenziazione in tubuli mesonefrici. Quindi, nonostante sia un'area che si propone a formare il metanefro, essa subisce una differenziazione in mesonefro. I nefroni metanefrici si formano invece solo in seguito alla crescita di un UB, in un animale con tre reni embrionali. In altre parole, la UB è assolutamente necessaria per lo sviluppo del metanefro.

Quindi, osservando la morfogenesi renale, risulta chiaro che alla base del processo ci sono due differenti popolazioni cellulari, entrambe di origine mesodermica. Quale delle due potrebbe meglio rappresentare la cellula staminale renale? E ancora, esiste una sola cellula progenitrice di tutti i tipi cellulari che compongono il parenchima renale?

Per molti anni si è supposto, nonostante non sia stato mai dimostrato, che i progenitori mesenchimali del MM derivassero dal mesoderma intermedio. Recenti studi hanno invece evidenziato che le cellule progenitrici nefrogeniche potrebbero derivare dalle cellule della UB. In effetti, le cellule della porzione apicale dell'abbozzo presentano le caratteristiche morfologiche di un epitelio che va incontro ad un processo di delaminazione²⁵. Oltre l'aspetto particolare, le cellule della sommità dell'abbozzo, al posto di un fenotipo epiteliale, esibiscono un fenotipo mesenchimale identico a quello delle cellule del MM. Conferme a queste osservazioni si sono avute utilizzando preparazioni di abbozzo ureterico prelevate da reni rudimentali dell'embrione di ratto, prive di cellule mesenchimali del metanefro, marcate con il colorante DiI o con il retrovirus BAG²⁵. Le co-culture di UB marcato e di MM non marcato dimostrarono la comparsa dopo 24 ore di crescita, di cellule-DiI o cellule infette (portatrici del gene virale lac-z, che codifica per la β -galattosidasi), anche all'interno del MM.

Quindi, secondo questo modello nefrogenico, la cellula epiteliale della UB sarebbe una cellula staminale primordiale multipotente, che andando incontro ad una transizione epitelio-mesenchima²⁵, si trasforma in un progenitore mesenchimale metanefrico. In altre parole, il blastema metanefrico non è capace di differenziarsi in metanefro finché non viene arricchito con le cellule prodotte

dalla transdifferenziazione EMT. Queste cellule in seguito, rappresentano il bersaglio del processo induttivo guidato dalla UB, dando luogo alla formazione di glomeruli e tubuli. Inoltre, elaborano fattori che mantengono la proliferazione della popolazione cellulare staminale della UB e inducono la delaminazione di altre cellule.

Nonostante ciò, risultati di altri studi si trovano in contrapposizione con questi dati, infatti, è stato dimostrato che anche le cellule mesenchimali del MM possono differenziarsi sia in cellule epiteliali del nefrone sia in quelle dei dotti collettori deponendo a favore del mesenchima del metanefro quale popolazione staminale renale³².

Decifrare il processo morfogenetico renale anche da un punto di vista molecolare avrebbe importanti implicazioni perché sarebbe in grado di fornire gli strumenti necessari per pilotare la proliferazione e differenziazione delle cellule staminali, indipendentemente dalla loro identificazione.

Negli ultimi anni, modelli sperimentali di topi knock-out e transgenici hanno permesso di identificare varie molecole che, durante lo sviluppo renale, dimostrano una funzione cruciale nel dialogo fra tessuti o fra cellule³³.

Innanzitutto, in un momento antecedente alla formazione della UB dal dotto di Wolff, sono stati trovati livelli elevati di GDNF (glial cell line derive neurotrophic factor) e del suo recettore c-RET, rispettivamente nel MM e nel dotto mesonefrico³⁴. Questa osservazione, insieme a quella dell'agenesia renale riscontrata nei topi knock-out per il gene del GDNF³⁵ o del c-RET, fanno fortemente sospettare che sia proprio il GDNF il segnale di induzione prodotto dal MM in grado di interagire con il dotto di Wolff e determinare l'emanazione

dell'UB. E' da notare che il recettore c-RET, inizialmente espresso da tutte le cellule del dotto mesonefrico, in seguito all'induzione dal GDNF limita la sua espressione in un'area vicino al blastema metanefrico, e subito dopo la formazione della UB, la limita ulteriormente a livello della regione apicale di esso, un'area in attiva crescita³³.

Per quanto riguarda i fattori di trascrizione implicati nel processo di induzione dell'UB da parte del MM, fino ad oggi sono stati identificati l'Eya1 e il Wt1. Topi knock-out per il gene Eya1³⁶, non producono GDNF, il che prova la sua diretta partecipazione nella regolazione dell'espressione di questo fattore. Al contrario, i topi knock-out per il Wt1³⁷, nonostante non siano capaci di formare la UB, esprimono ugualmente il fattore GDNF nel MM.

Di conseguenza, il GDNF non può essere l'unico fattore responsabile, ma più molecole di induzione sono necessarie contemporaneamente per la formazione dell'UB.

Secondo quanto già menzionato, la UB, una volta formata, invade il MM e induce la nefrogenesi. Allo scopo di identificare i fattori implicati nella iniziazione del processo nefrogenico, è stato eseguito un esperimento in cui il medium condizionato proveniente da una linea cellulare ottenuta dall'UB è stato messo a contatto con campioni di MM, ed è stata osservata la sua capacità di indurre la formazione di nefroni. Metodi di purificazione proteica hanno permesso di isolare il LIF³⁸ (leucemia inhibiting factor) come induttore della nefrogenesi e il FGF2³⁹ come fattore in grado di garantire la sopravvivenza e la crescita del blastema. Tuttavia, topi knock-out per il gene LIF³⁸ non hanno presentato anomalie nello sviluppo renale dimostrando che, anche in questo caso, è necessaria l'azione

sincrona di varie molecole correlate, compresi alcuni membri della famiglia Wnt, e in particolare Wnt11⁴⁰.

Le molecole di induzione ricordate (LIF, FGF2, Wnt11), prodotte dalle cellule della sommità dell'UB, sono tutte sotto il controllo dello stesso fattore di trascrizione: Emx2. Topi knock-out per l'Emx2⁴¹ presentano la formazione dell'UB, l'invasione del MM, ma non lo sviluppo dei reni.

Il segnale induttivo, qualunque esso sia, deve interagire con una serie di recettori presenti sul versante del blastema, ma recenti studi, suggeriscono anche il coinvolgimento dei proteoglicani della matrice extracellulare come attori importanti nella ricezione dei segnali⁴². I proteoglicani si comportano da cofattori, poiché svolgono un importante ruolo nella presentazione delle molecole-segnale ai loro recettori, permettendo così, l'accessione del programma nefrogenico.

L'interazione del LIF e degli altri fattori di induzione finora noti con i loro recettori, scatena nel blastema una serie di eventi molecolari. Uno dei primi è l'induzione dei fattori di trascrizione Pax2 e Wt1 e l'espressione della molecola-segnale Bmp7.

L'espressione del Pax2 nel MM sembra indispensabile per indurre la sua transizione ad epitelio⁴³. Analogamente Wt1, attivato dal Pax2⁴⁴, risulta responsabile oltre che per l'induzione della UB, anche per quella del blastema. L'espressione di entrambi questi fattori di trascrizione è continuamente richiesta, anche durante le fasi più tardive della nefrogenesi.

In realtà, Pax2 e Wt1 sembrano formare un circuito finemente e strettamente regolato. Pax2 è uno dei primi geni indotti dall'uretere, in grado di iniziare il programma dell'epitelizzazione del blastema e attivare il Wt1, ma, in seguito

all'interazione con un fattore non ben identificato, si trasforma in un fattore di trascrizione con attività di repressore. Di conseguenza, dopo una iniziale, indispensabile co-espressione, i due fattori di trascrizione vengono reciprocamente esclusi⁴⁵. Questo è importante per la differenziazione dei vari componenti nefritici. Infatti, dopo la comparsa dei primitivi tubuli ad S, l'espressione del Wt1 viene limitata alla parte prossimale di essi destinata a produrre i podociti, mentre l'espressione del Pax2 viene limitata a quella distale, destinata a differenziarsi in altre parti del nefrone⁴⁵.

La molecola-segnale Bmp7 rappresenta un target comune di tutti e due i fattori di trascrizione. Recenti studi suggeriscono che il Bmp7 sopprima la tubulogenesi nel MM indotto⁴⁶, in modo da regolare la rapidità del processo e mantenere una zona di attiva nefrogenesi. In accordo con questo ruolo è anche la capacità del Bmp7 di stimolare la proliferazione della popolazione dei precursori stromali⁴⁷. In effetti, entrambi le azioni del Bmp7 contribuiscono a mantenere una quota di blastema, in grado di prolungare la crescita del rene durante l'embriogenesi.

Nel rene in via di sviluppo le cellule stromali sono, insieme alle cellule epiteliali del nefrone e dell'uretere, la terza popolazione cellulare in gioco nel processo induttivo reciproco che porta alla crescita e allo sviluppo renale. Le cellule stromali infatti, inviano segnali di cruciale importanza al MM, che a sua volta risponde elaborando fattori indispensabili per il mantenimento e l'espansione della componente stromale. La scoperta del BF-2, fattore di trascrizione specifico stromale, e lo sviluppo di malformazioni renali nei topi knock-out per il suo gene, hanno ben evidenziato la partecipazione dei precursori stromali nel processo di differenziazione del blastema, sia nelle zone interne (sistema dei collettori) che

periferiche (nefroni)⁴⁸. Il ruolo dello stroma quindi, non deve essere sottovalutato, anche perché il rene rappresenta l'unico esempio dove l'interazione tra epitelio e stroma, con l'intento di preservare l'integrità funzionale dell'organo, continua a livelli molto elevati anche durante la vita adulta.

Prima di concludere l'embriogenesi, è importante riferire che è stato identificato un momento della vita embrionale che rappresenterebbe l'esatta origine del rene adulto²¹. In effetti, all'11° giorno di vita embrionale del topo (5a settimana dell'uomo), si possono distinguere nel rene pre-natale tutti i tipi di precursori necessari per lo sviluppo di un rene adulto funzionante. Si considerano implicati 5 precursori che daranno origine nel rene post-natale ad almeno 26 diversi tipi di cellule differenziate, facilmente riconoscibili per la loro morfologia, localizzazione e funzione. Negli ultimi anni, sono stati accumulati diversi dati che mettono in risalto la grande capacità di queste cellule di proliferare e differenziarsi. Una volta trapiantate, queste cellule hanno prodotto in vivo dei piccoli reni composti da un complesso di nefroni con i loro dotti collettori. Questi reni in miniatura sono risultati funzionanti, come dimostrato dal ritrovamento di urina diluita all'interno dei dotti.

Tali importanti risultati sperimentali forniscono la prova che i precursori del rene adulto prelevati dall'embrione precoce rappresentano una importante risorsa di cellule in grado di garantire la rigenerazione renale una volta trapiantate. Queste cellule sono una futura promessa per il trapianto renale.

CELLULE STAMINALI RENALI

LA RIGENERAZIONE RENALE E LA RICERCA DELLE CELLULE STAMINALI RENALI

Il rene è un organo con notevole capacità rigenerativa. L'insulto da ischemia-riperfusione, ad esempio, determina necrosi ed apoptosi delle cellule epiteliali tubulari, con conseguente denudamento della membrana basale e perdita della capacità di concentrazione dell'urina. In seguito, si ha attivazione della proliferazione cellulare, come segnalato dall'espressione del PCNA (proliferating cell nuclear antigen), rigenerazione dei tubuli danneggiati e ripristino della loro normale architettura e funzione⁴⁹. Appare evidente, quindi, come da un punto di vista clinico la comprensione dei meccanismi di riparazione del danno tubulare sia cruciale per sviluppare strategie in grado di migliorare il recupero della funzionalità renale dopo episodi di Insufficienza Renale Acuta (IRA).

Attualmente si ritiene che i possibili meccanismi coinvolti nel processo di rigenerazione renale siano quattro (Figura 3). Questi meccanismi non si escludono a vicenda ed è verosimile che più di uno partecipi al processo di rigenerazione renale. I meccanismi proposti sono i seguenti:

- 1) cellule terminali completamente differenziate sarebbero in grado di proliferare e produrre cellule figlie identiche a se stesse.
- 2) cellule terminali completamente differenziate andrebbero incontro ad un processo di dedifferenziazione, a cui segue la ridifferenziazione in diverse linee cellulari.

- 3) cellule staminali e precursori di origine extra-renale sarebbero reclutati nel rene danneggiato per differenziare in più tipi di cellule mature o in un solo tipo cellulare.
- 4) cellule staminali multipotenti residenti nel rene sarebbero in grado di generare tutti i tipi cellulari necessari per il ripristino dell'integrità del nefrone.

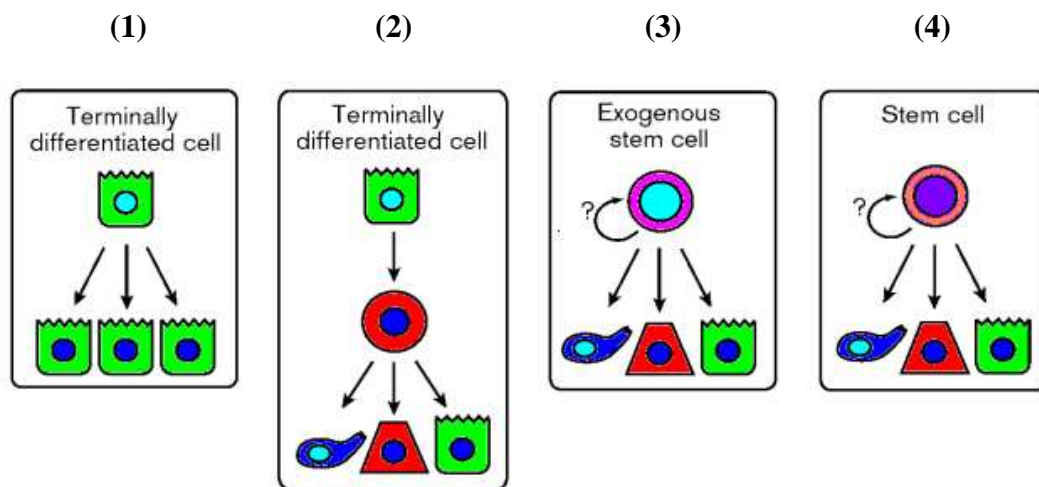


Figura 3. Possibili meccanismi coinvolti nel processo di rigenerazione renale. Modificato da Oliver JA, *Curr Opin Nephrol Hypertension* 2004, 13:17–22

Nel primo caso, quindi, più tipi di cellule differenziate dovrebbero essere reclutati per sostituire le varie componenti del nefrone. E' ormai noto che le cellule specializzate dei tubuli renali rappresentano una fonte di "regenerating kidney cells" (RKC)^{50,51}. Queste cellule si trovano in uno stato di relativa quiescenza, con un tasso di replicazione molto basso. Dopo la perdita di una parte del parenchima renale, si assiste ad un'ondata proliferativa proporzionale all'entità della perdita, che coinvolge sia il compartimento epiteliale che interstiziale del parenchima residuo.

In effetti, la nefrectomia unilaterale comporta un'ipertrofia compensatoria del rene controlaterale, caratterizzata da un aumento della massa renale e della velocità di filtrazione glomerulare (Glomerular Filtration Rate o GFR). L'HGF secreto dalle cellule stromali gioca un ruolo importante in questo tipo di risposta ed esplica la sua azione con meccanismo endocrino, paracrino ed autocrino⁵². Le cellule epiteliali rispondono allo stimolo incrementando l'espressione del recettore specifico dell'HGF, c-Met. L'interazione HGF/c-Met sulla cellula tubulare attiva una cascata di segnali intracellulari che sono mitogenici e antiapoptotici. Questo meccanismo è, quindi, un evento chiave del fenomeno morfogenetico di rigenerazione e riflette l'importanza dell'interazione tra epitelio e mesenchima.

Il secondo meccanismo è un fenomeno analogo a quanto avviene durante l'embriogenesi nel periodo nefrogenico. In particolare, è ormai accettato che un ulteriore meccanismo di risposta del rene ad eventi lesivi è costituito dalla dedifferenziazione delle cellule del tubulo prossimale^{50,53}.

Esaminando⁵⁴ reni umani e di modelli animali affetti da IRA indotta da ischemia e riperfusione, si è giunti alla conclusione che la riparazione del tubulo in seguito al danno è mediata dalle cellule tubulari che confinano con la regione danneggiata. Dopo l'insulto, infatti, queste cellule perdono rapidamente l'orletto a spazzola e dedifferenziano verso un fenotipo più mesenchimale. Questo processo sembra essere seguito dalla migrazione delle cellule dedifferenziate verso le regioni in cui la necrosi cellulare, l'apoptosi ed il distacco delle cellule hanno denudato la membrana basale tubulare. In questa sede, esse proliferano ed, eventualmente, ridifferenziano in un fenotipo epiteliale, completando il processo di riparazione.

In generale, si è osservato che il rilascio locale di fattori di crescita, come HGF, EGF, IGF-1, ma anche TGF- β , PDGF e LIF, sembra coordinare questo processo di dedifferenziazione, migrazione, proliferazione ed, eventualmente, ridifferenziazione⁵⁵.

In un modello sperimentale di topi transgenici le cui cellule epiteliali tubulari^{53,56} esprimevano il marcatore lac-z, è stato possibile riprodurre un processo nefrosclerotico dopo ostruzione ureterale unilaterale, ed osservare che le cellule lac-z cambiavano la loro morfologia, si spostavano nell'interstizio ed esprimevano il marcatore dei fibroblasti FSP-1 (fibroblast specific protein-1). Questo dato dimostra che la proliferazione cellulare che segue il danno renale è probabilmente associata ad una transizione epitelio-mesenchima (epithelial-mesenchymal transition o EMT). E' quindi probabile che, quando l'insulto è di modesta entità, i fibroblasti che derivano dal processo di dedifferenziazione non producano collagene e si ridifferenzino in cellule epiteliali, contribuendo alla riparazione tubulare.

La dedifferenziazione sembra, dunque, rappresentare un fondamentale passaggio del processo rigenerativo tubulare e sembra precedere il recupero dell'integrità tubulare. Tuttavia, la EMT nel rene adulto rappresenta anche uno dei momenti cruciali per il transdifferenziamento della cellula tubulare in miofibroblasto, la cellula effettrice della fibrosi renale. Quando la perdita di massa nefronica è eccessiva, la proliferazione osservata nel parenchima superstite è sostenuta soprattutto da fibroblasti e non porta ad alcun beneficio funzionale, bensì alla formazione di tessuto fibro-cicatriziale. La fibrosi post-nefrectomia e post-ischemia grave può quindi essere definita come una rigenerazione mal riuscita. In

effetti, nell'ambito del tessuto sclerotico si osservano frequentemente tubuli ipertrofici e cisti epiteliali, che rappresenterebbero tentativi falliti di rigenerare l'organo⁵⁰.

Un altro meccanismo coinvolto nel processo di rigenerazione renale prevede il reclutamento nel rene danneggiato di cellule staminali e precursori di origine extra-renale che differenziano in uno o più tipi cellulari.

Per dimostrare il contributo di cellule staminali circolanti provenienti dal midollo osseo (BMSC, bone marrow-derived stem cells) nella rigenerazione renale, alcuni autori^{57,58} hanno analizzato i reni di pazienti maschi dopo trapianto da donatore femmina. A livello delle strutture tubulari è stata identificata una bassa percentuale di cellule contenenti il cromosoma Y che presentavano morfologia e marcatori di tipo epiteliale. L'osservazione del fenotipo acquisito ha suggerito in modo più diretto che le BMSC potessero differenziarsi in cellule epiteliali renali, contribuendo al normale turnover cellulare.

Gli stessi dati sono stati ottenuti in un modello murino di danno da ischemia-riperfusionne trattato con BMSC (Lin-, Sca-1+, c-kit+) isolate da topi maschi ROSA26 (che esprimono la β -galattosidasi), dimostrando così che le BMSC possono essere reclutate nel rene danneggiato, e sono in grado di differenziare in cellule epiteliali e di partecipare al recupero della funzionalità renale⁵⁹.

Morigi e coll.⁶⁰ hanno inoculato separatamente HSC e MSC, per confrontare il corrispettivo ruolo di questi due tipi cellulari del midollo osseo nella riparazione di un danno tubulare indotto dal cisplatino nel topo. L'infusione di MSC purificate in un topo femmina successivamente esposto al cisplatino è stata accompagnata da un minor incremento di azoto ureico (BUN) e da una maggiore

risposta proliferativa delle cellule tubulari. Anche da un punto di vista istologico, i reni mostravano un ridotto grado di danno tubulare. In confronto, l'infusione di HSC ha determinato solo un minimo beneficio.

Studi più recenti^{61,62} sembrano, invece, ridimensionare il contributo delle cellule BMSC nel processo di rigenerazione tubulare dopo un danno acuto.

Duffield⁶² e coll. hanno dimostrato come, in seguito all'induzione di ischemia, le BMSC non si localizzano a livello del rene danneggiato e come la riparazione del tubulo sia garantita dalle stesse cellule tubulari. Essi hanno studiato la riparazione renale in topi chimerici esprimenti EGFP (enhanced green fluorescent protein) o β -galattosidasi, oppure valutando la presenza del cromosoma Y in cellule derivate dal midollo osseo. Nelle chimere EGFP positive, solo alcune cellule interstiziali, ma non tubulari, esprimevano EGFP dopo il danno ischemico e più del 99% di queste cellule erano leucociti. Nelle chimere β -gal, alcune cellule tubulari sembravano esprimere la β -galattosidasi, come dimostrato dallo staining dell'*x-gal*, ma, in seguito alla soppressione della β -galattosidasi endogena, nessuna cellula tubulare risultava essere ancora positiva all'*x-gal* dopo il danno ischemico. In uno studio di Lin e coll.⁶¹ sono stati utilizzati topi transgenici che esprimevano specificamente e permanentemente EGFP nelle cellule mature dei tubuli renali. Dopo IRI (ischemia reperfusion injury), le cellule EGFP positive presentavano incorporazione di BrdU ed espressione di Pax-2 e vimentina, suggerendo che la comparsa di nuove cellule nei tubuli rigenerati aveva un'origine epiteliale tubulare. Inoltre, nei topi transgenici trapiantati con BMSC, l'89% delle cellule epiteliali proliferanti proveniva dalle cellule dell'ospite mentre solo l'11% proveniva dalle BMSC del donatore. Ventotto giorni dopo l'IRI, i reni dei topi

trapiantati contenevano cellule del donatore in una percentuale valutabile intorno all'8%, di cui solo 8,4% di cellule epiteliali, il 10,6% di cellule glomerulari e 81% di cellule interstiziali, identificate in quanto positive per α -SMA, marcatore dei miofibroblasti. Quindi, tali risultati evidenziano il ruolo preminente di cellule di origine intrarenale nel processo di rigenerazione e il contributo delle BMSC alla fibrosi interstiziale. Un recente studio di Kunter e coll., infine, ha dimostrato che nel topo, il trattamento con BMSC, in risposta all'insufficienza renale indotta, inizialmente benefico nel preservare i glomeruli danneggiati e mantenere la funzionalità d'organo, sfocerebbe a lungo termine in una maldifferenziazione delle MSC integrate in adipociti, accompagnata da sclerosi glomerulare⁶³. Di conseguenza, ora si ritiene che le cellule di derivazione midollare abbiano un ruolo protettivo, piuttosto che rigenerativo, nei confronti del danno da insulto ischemico.

Anche lo studio delle citochine prodotte a livello renale è a sostegno di questa ipotesi. Sia Zhang e coll.⁶⁴ che Togel⁶⁵ e coll. hanno osservato un aumento dell'espressione di G-CSF e di SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) in cellule tubulari renali dopo un insulto ischemico. Contemporaneamente, sono espresse però anche citochine con attività pro-infiammatoria (IL-1, IL-6), con conseguente reclutamento delle cellule infiammatorie a livello renale. In effetti, nei primi giorni dopo l'IRI, sono soprattutto i leucociti a popolare l'interstizio renale. In realtà, non è ancora chiaro quando vengono rilasciati fattori in grado di mobilitare cellule infiammatorie ed esacerbare l'IRA, e quando invece vengono reclutate soprattutto MSC in grado di contribuire alla riparazione renale, consentendo di superare l'episodio di insufficienza renale acuta⁶⁶.

Herrera e coll.⁶⁷ nel loro modello *in vivo* di IRA glicerolo-indotta hanno studiato l'espressione di citochine da parte del tessuto lesa, osservando, in seguito all'infusione delle MSC, una ridotta produzione delle citochine pro-infiammatorie e un aumento di fattori di crescita tipo FGF (Fibroblast Growth Factor) o TGF- α . Si potrebbe quindi concludere che le MSC abbiano un ruolo protettivo nei confronti delle cellule renali (tramite un meccanismo paracrino/endocrino) piuttosto che rigenerativo.

Nonostante il meccanismo del ruolo protettivo da parte delle cellule di derivazione midollare non sia stato ancora perfettamente decifrato, Togel e coll.⁶⁸ hanno dimostrato chiaramente che le MSC possono produrre vari fattori di crescita, come VEGF, HGF, IGF-1. In altri contesti è stato osservato che le MSC hanno un ruolo inibitorio nei confronti della risposta immunitaria ed infiammatoria, riducendo l'espressione di citochine proinfiammatorie. Di conseguenza, le MSC potrebbero diminuire il danno da ischemia o rabdomiolisi, prevenendo l'infiltrazione di cellule infiammatorie e la morte delle cellule tubulari per apoptosi (Figura 4). Un recente studio di Bi e coll.⁶⁹ dimostra inoltre, tramite inoculo *in vivo* di medium condizionato in topi affetti da NTA, che le BMSC sono in grado di proteggere il rene da insulto tossico attraverso la secrezione di fattori che riducono l'apoptosi e aumentano la proliferazione di cellule tubulari endogene, senza necessità di integrazione da parte delle cellule stesse nel parenchima danneggiato.

Allo scopo di conoscere la capacità delle BMSC di promuovere la riparazione tubulare dopo il danno, si è utilizzato anche un altro approccio: la mobilitazione in circolo di BMSC endogene, ottenuta applicando alcuni protocolli di

mobilizzazione delle BMSC a livello periferico su topi con danno tubulare acuto, praticati normalmente ai fini del trapianto di midollo osseo. I risultati sono stati vari e diversi tra loro. Togel e coll⁷⁰ in seguito alla mobilizzazione di HSC hanno osservato una eccessiva risposta infiammatoria nel rene danneggiato dall'ischemia, probabilmente dovuta all'aumento dei leucociti circolanti, in seguito alla somministrazione di G-CSF.

Al contrario, altri gruppi hanno osservato che la mobilizzazione delle HSC protegge i topi dall'IRA^{66,71} e accelera la riduzione della creatinina e dell'azoto ureico (BUN) 4 giorni dopo la somministrazione di cisplatino. Questi autori, quindi, attribuiscono l'effetto protettivo ad una riduzione dell'infiltrato infiammatorio. Non è ancora noto se questi fattori mobilizzino le MSC in aggiunta alle HSC o se le MSC siano fisiologicamente mobilizzate all'uscita del midollo osseo in numero consistente e sotto determinate condizioni.

L'opinione corrente, quindi, è che sia la proliferazione di cellule endogene renali, piuttosto che l'attecchimento delle MSC, a determinare il recupero dell'integrità tubulare e della funzionalità renale⁵⁴.

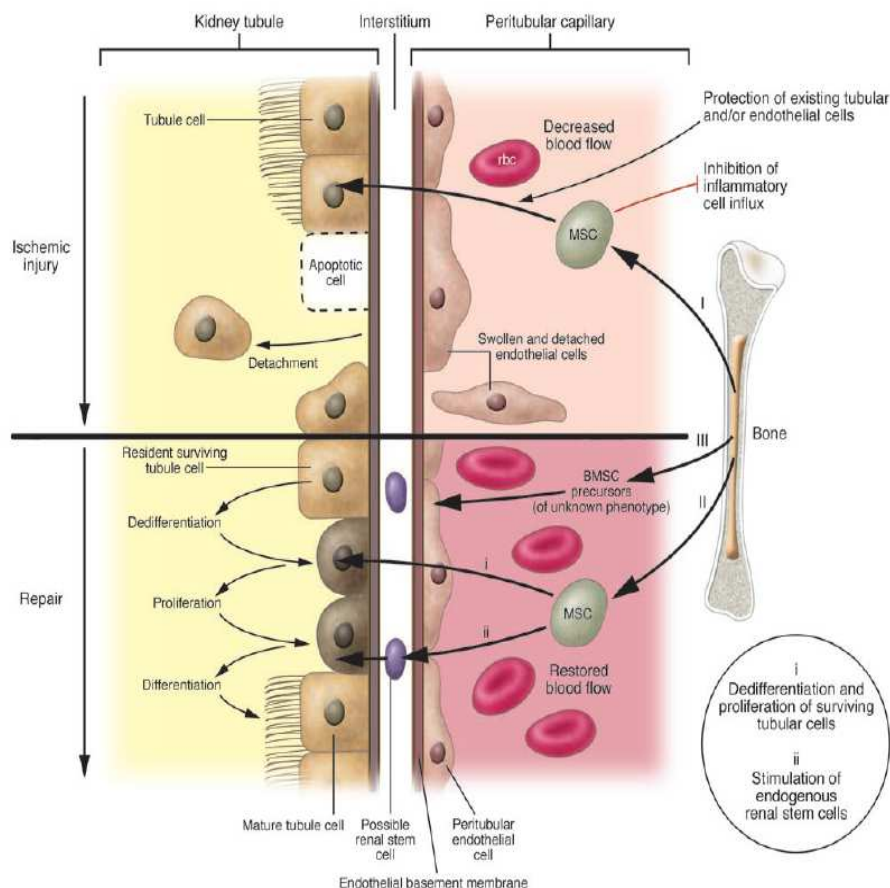


Figura 4. Potenziale ruolo delle cellule derivate da midollo osseo nella protezione/riparazione renale. Diane Krause and Lloyd G. Cantley. *Bone marrow plasticity revisited: protection or differentiation in the kidney tubule?* *J Clin Invest* 2005, 115: 1705-1708.

Infine, il quarto possibile meccanismo proposto per spiegare il processo di rigenerazione renale postula l'esistenza di cellule staminali multipotenti residenti nel rene in grado di generare tutti i tipi cellulari necessari per il ripristino dell'integrità del nefrone.

Alla luce delle evidenze sperimentali acquisite più recentemente, si è ormai abbastanza certi che anche nel rene esista una nicchia di cellule staminali multipotenti. A differenza, però, dell'epitelio dell'intestino e dell'epidermide, che dispongono di un compartimento proliferativo ben distinto, a livello renale risulta difficile circoscrivere la zona in cui queste cellule risiedono.

Recentemente, il nostro gruppo ha dimostrato l'esistenza di una popolazione di cellule progenitrici multipotenti nel rene umano adulto⁵. Queste cellule rappresentano una sottopopolazione di cellule epiteliali parietali localizzate a livello del polo urinifero della capsula di Bowman e sono state denominate *Adult Parietal Epithelial Multipotent Progenitors* (APEMP). Le APEMP sono caratterizzate dall'espressione di due marcatori di staminalità, il CD24 ed il CD133, e di specifici fattori di trascrizione delle cellule staminali quali Oct-4 e Bmi-1, mentre mancano di marcatori specifici di lineage. Se confrontate con tutti gli altri tipi di cellule renali, le APEMP, esprimono anche il marcatore CD106, una molecola di superficie che assieme ai marcatori CD105, CD54, e CD44 è abitualmente co-espressa da altri tipi di SC adulte che crescono in aderenza, come le cellule mesenchimali staminali o i progenitori multipotenti adulti^{72,73}. Le APEMP purificate, possono essere ottenute direttamente dalla crescita che si realizza a partire dalle strutture glomerulari isolate in coltura, ed esibiscono alta clonogenicità e elevato potenziale di auto-rinnovamento. Inoltre, in condizioni appropriate di coltura, i cloni derivanti da una singola cellula possono essere indotti a differenziare in cellule epiteliali tubulari che mostrano vari marcatori specifici di differenti porzioni del nefrone.

Per di più, cellule derivate da uno stesso clone di APEMP, possono essere indotte a differenziare verso vari tipi cellulari extra-renali, come gli adipociti, gli osteoblasti, o cellule che esibiscono marcatori fenotipici e proprietà funzionali dei neuroni, come è già stato descritto per altri tipi di SC adulte^{74,75}. Questi risultati, suggeriscono fortemente che le APEMP rappresentino una popolazione di progenitori multipotenti. In accordo con i dati ottenuti *in vitro*, le APEMP ,

iniettate in un modello murino di IRA glicerolo-indotta, mostrano potenzialità rigenerativa, andandosi ad integrare nell'organo e migliorando anche il danno renale, sia da un punto di vista morfologico che funzionale⁵.

L'INSUFFICIENZA RENALE ACUTA

L'insufficienza renale acuta (IRA) è una sindrome frequente in patologia umana, caratterizzata da una riduzione rapida e severa della filtrazione glomerulare che determina accumulo di prodotti di scarto azotati (urea e creatinina) e non azotati in circolo. In relazione alla gravità e alla durata dell'insufficienza renale, l'accumulo di scorie azotate è accompagnato da disturbi metabolici come acidosi metabolica, iperpotassiemia e ipervolemia, con effetti dannosi su molti altri organi ed apparati. Infatti, il quadro di IRA oscilla da forme severe, che richiedono il trattamento sostitutivo della funzione renale mediante emodialisi extracorporea, a forme caratterizzate soltanto da lievi incrementi della creatinina sierica. L'IRA quindi può essere definita in generale come un aumento acuto e rilevante della concentrazione della creatinina sierica (ad esempio un incremento superiore al 20% rispetto al limite massimo di normalità⁷⁶).

A scopo diagnostico-terapeutico, le cause di IRA possono essere suddivise in tre principali gruppi:

- *IRA prerenale*: causata da una riduzione della perfusione renale in reni morfologicamente normali, costituisce circa il 55% dei casi di IRA;
- *IRA intrinseca o organica*: dovuta a malattie del parenchima renale, si riscontra in circa il 40% dei casi;
- *IRA postrenale*: causata da malattie ostruttive del tratto urinario, generalmente si manifesta con un esordio acuto e costituisce circa il 5% dei casi.

L'IRA prerenale, in cui è preservata l'integrità del tessuto, è la conseguenza della risposta fisiologica del tubulo renale all'ipoperfusione glomerulare (Feedback tubulo-glomerulare).

L'IRA prerenale può aggravare patologie caratterizzate da ipovolemia e può essere determinata da varie condizioni cliniche, quali la riduzione della gittata cardiaca, in corso di scompenso cardiaco, o la vasodilatazione sistemica, in corso di shock settico. Il rene si adatta alle variazioni della pressione di perfusione autoregolando il flusso ematico renale e la velocità di filtrazione glomerulare (Glomerular Filtration Rate o GFR). Il meccanismo di feedback tubulo-glomerulare stabilizza sia la GFR che il volume dell'ultrafiltrato che giunge al tubulo distale, ed è mediato da una complessa comunicazione tra la macula densa e la rete capillare pre-glomerulare. L'IRA prerenale può essere corretta se i fattori extrarenali che causano l'ipoperfusione vengono eliminati. In caso contrario, l'ipoperfusione renale persistente può determinare la necrosi tubulare acuta ischemica e l'instaurarsi di un danno parenchimale (IRA organica).

Per quanto riguarda l'IRA postrenale, la riduzione del GFR causata da ostruzione urinaria può essere completamente abolita se la causa viene rimossa con tempestività (nefrourolitiasi, ipertrofia prostatica benigna, neoplasia del tratto urinario); la maggior parte delle uropatie ostruttive, infatti, risponde positivamente alle terapie, con prognosi generalmente buona.

La necrosi tubulare acuta (NTA) è la principale causa di IRA organica, e costituisce il quadro più comune di danno del parenchima renale (Figura 5). La NTA può essere la conseguenza di un danno renale tossico o ischemico del rene, ma, pur riconoscendo una numerosa varietà di noxae patogene differenti, si manifesta con un quadro istopatologico e fisiopatologico comune.

In realtà, l'IRA prerenale e la NTA ischemica riconoscono lo stesso processo fisiopatologico ed insieme costituiscono il 75% delle cause di IRA. Anche se i

termini insufficienza renale acuta e necrosi tubulare acuta hanno in realtà definizioni e significati differenti, sono comunemente utilizzati come sinonimi nella pratica clinica.

La problematica clinica più rilevante legata alla NTA resta, però, la prognosi “*quo ad functionem*”, che sia a medio che a lungo termine, non è eccellente. Nonostante i significativi progressi delle terapie di supporto, negli ultimi trent’anni non si è verificato un incremento significativo nel recupero funzionale e nella riparazione del danno renale⁷⁷. Infatti, il tasso di mortalità, che può variare ampiamente a seconda della causa, ed il tasso di comorbilità (dal 5% in pazienti senza altre serie condizioni morbose, al 90% in pazienti critici con insufficienza multi-organo), ad oggi superano mediamente il 50%. Dall’altra parte, il 50% dei pazienti che sopravvivono dopo NTA e recuperano una funzionalità renale soddisfacente presentano un danno istologico residuo subclinico, documentabile soltanto mediante biopsia renale. Addirittura, il 5% dei pazienti sopravvissuti (si considera che tale percentuale salga al 16% se si tratta di soggetti di età superiore ai 65 anni) presenta una IRA irreversibile che richiede terapia sostitutiva a lungo termine mediante dialisi o trapianto di rene. Un altro 5% dei pazienti, sopravvissuti dopo una fase iniziale di recupero, presenta un progressivo declino della funzionalità renale, probabilmente dovuta ad una parziale sostituzione del parenchima danneggiato con tessuto fibro-cicatriziale e conseguente stress emodinamico e sclerosi glomerulare dei nefroni residui^{78,79}. La NTA, quindi, è un ottimo modello per studiare i meccanismi che determinano il danno e la riparazione del parenchima renale con il conseguente ripristino della funzione renale.

Nella patogenesi della NTA si possono riconoscere due importanti componenti⁷⁹: la componente vascolare, legata alla vasocostrizione dell'arteriola afferente con riduzione della pressione di filtrazione glomerulare, congestione vascolare nella midollare esterna, ed attivazione del feedback tubulo-glomerulare; e la componente tubulare, che segue l'ostruzione tubulare ed è determinata dal ritorno transtubulare del filtrato e dalla conseguente infiammazione interstiziale.

Quando è possibile riconoscere l'evento scatenante dell'IRA, il suo quadro clinico può manifestarsi con la successione di tre fasi⁸⁰:

- fase iniziale;
- fase di mantenimento;
- fase di recupero (nei casi in cui, come in corso di necrosi tubulare acuta, l'IRA sia reversibile).

La fase iniziale è caratterizzata prevalentemente da oliguria o anuria. I sintomi e i segni dipendenti da alterazioni dell'omeostasi idroelettrolitica non sono immediatamente evidenti, anche se è possibile dimostrare un progressivo aumento della concentrazione sierica di urea e creatinina.

La fase di mantenimento coincide con l'espressione conclamata dei sintomi e segni. In questa fase, il flusso plasmatico renale (FPR) e, conseguentemente, la velocità di filtrazione glomerulare (GFR) precipitano fino al 50%⁸¹ del valore basale.

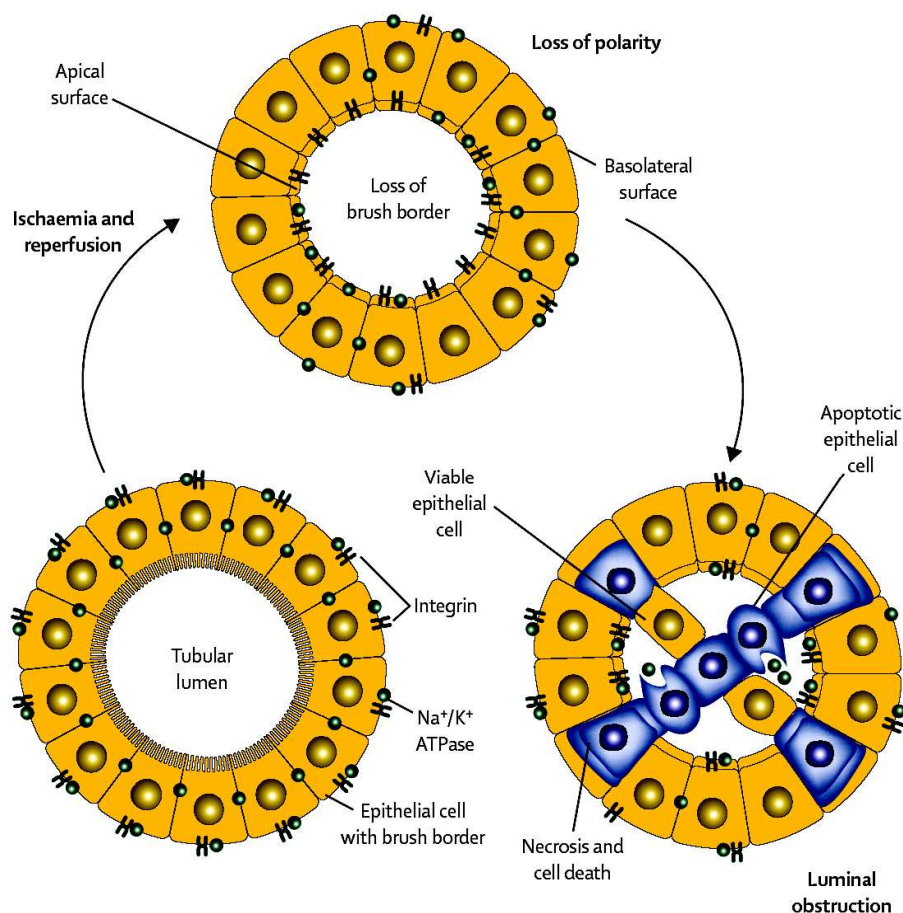


Figura 5. Cambiamenti tubulari nella fisiopatologia della necrosi tubulare acuta dopo ischemia. Norbert Lameire et al., *Lancet* 2005, 365 : 417-30.

Come suggerisce il nome, nella necrosi tubulare acuta il bersaglio del danno da ipoperfusione è costituito dalle cellule tubulari che mostrano da subito segni di sofferenza. Dal punto di vista istologico, le caratteristiche della NTA si possono inquadrare in cinque punti:

- A) Diffusa perdita dell'orletto a spazzola del tubulo prossimale.
- B) Perdita della polarità cellulare, con collocazione anomala di molecole di adesione, come le integrine, e di altre proteine di membrana, come la Na/K ATPasi.
- C) Apoptosi e necrosi.

D) Denudamento a tratti della membrana basale, per l'esfoliazione di cellule, vitali e non, nel lume tubulare.

E) Ostruzione tubulare con formazione di cilindri ialini.

Le cellule più gravemente danneggiate vanno incontro a necrosi, caratterizzata da vacuolizzazione cellulare, disgregazione mitocondriale, perdita dell'integrità del plasmalemma con rilascio dei componenti intracellulari e conseguente attivazione di una risposta infiammatoria; un danno cellulare submassimale determina invece una parziale deplezione di ATP, ed attiva il processo apoptotico. L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un processo che richiede energia ed è caratterizzata morfologicamente da picnosi e successiva frammentazione nucleare, dalla formazione di corpuscoli a livello del plasmalemma e dalla disintegrazione cellulare in vescicole rivestite di membrana che vengono rapidamente fagocitate senza innescare una risposta infiammatoria. Le cellule apoptotiche compaiono caratteristicamente nella fase di mantenimento della NTA, ed i meccanismi molecolari alla base di questa prima ondata apoptotica sono in questo momento oggetto di numerosi studi^{82,83}. Si potrebbe affermare che l'inibizione selettiva di questo processo cruciale rappresenti una strategia promettente per ridurre l'entità della perdita di elementi cellulari che caratterizza la NTA. Cellule rigeneranti sono evidenziabili frequentemente nelle biopsie insieme a cellule con alterazioni morfologiche, a dimostrazione dell'alternanza di più cicli di danno e di riparazione. La rigenerazione cellulare prevale durante la terza fase della NTA, quella di recupero. In questa fase, oltre alla presenza di cellule rigeneranti, si osserva anche la comparsa di una seconda ondata di cellule apoptotiche. La seconda ondata apoptotica costituisce probabilmente un

meccanismo di controllo della iperproliferazione cellulare dovuta ad una stimolazione eccessiva della proliferazione cellulare, facilitando così il rimodellamento ed il ripristino dell'integrità tubulare.

La maggior parte delle cellule subisce un danno subletale, mantenendo di conseguenza la capacità di recupero morfo-funzionale. Le cellule più gravemente danneggiate si perdono per apoptosi e per necrosi. Tuttavia, anche le cellule danneggiate in modo subletale vanno incontro ad importanti modificazioni strutturali e metaboliche, responsabili di molte delle caratteristiche della NTA. La deplezione prolungata dell'ATP scatena una sequenza di eventi, mediati soprattutto dall'accumulo intracellulare di Ca^{++} , conseguente al malfunzionamento della pompa Ca^{++} -ATPasi di membrana. L'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{++} è responsabile di una serie di alterazioni cellulari, quali il danno mitocondriale, l'attivazione di proteasi e fosfolipasi, la generazione di ROS e la disintegrazione del citoscheletro. Il Ca^{++} intracellulare è fondamentale per l'integrità dell'actina del citoscheletro⁸⁴, che a sua volta è cruciale in vari aspetti della biologia della cellula tubulare, come il mantenimento della polarità, la disposizione delle proteine di membrana, la struttura dei microvilli e delle tight-junctions ed i rapporti intercellulari. Venendo a mancare il sostegno per i microvilli, si verificano il distacco e la caduta nel lume dell'orletto a spazzola, con perdita funzionale, oltreché l'ostruzione del lume tubulare. Inoltre, l'allentamento delle tight-junctions ed il denudamento della membrana basale, per la perdita delle cellule di rivestimento, sono responsabili della retrodiffusione del filtrato glomerulare. Il cambiamento della disposizione delle β_1 -integrine sulla membrana⁸⁵ determina l'interruzione dei rapporti di adesione cellula-cellula e

cellula-membrana basale, nonché l'esfoliazione di cellule vitali nel lume tubulare. Infatti, si considera che siano responsabili dell'occlusione tubulare le cellule vitali e non le cellule necrotiche. Le β_1 -integrine mediano l'adesione anche tra le cellule esfoliate, contribuendo ulteriormente alla formazione di ammassi e cilindri intraluminali. Questo fenomeno può essere contrastato *in vitro* in modelli di NTA sperimentale infondendo oligopeptidi contenenti la sequenza RGD (Arg-Gly-Asp); tale sequenza, presente nei recettori per l'integrina, satura i siti di legame sulle cellule tubulari esfoliate e ne impedisce l'aggregazione, contenendo il deterioramento della funzionalità renale⁸⁶.

Un ruolo di rilievo nel mediare il danno della NTA è attribuito anche ai radicali dell'ossigeno, i ROS⁸⁷. Le fonti di ROS sono l'enzima inducibile xantina-ossidasi, i mitocondri danneggiati, i polimorfonucleati (PMN) richiamati nella sede della lesione e l'interazione del superossido con l'ossido nitrico prodotto dall'ossido nitrico-sintasi indotta da danno ischemico o nefrotossico. Il danno mediato da ROS è stato inoltre osservato, nel ratto, in presenza di eccessiva disponibilità di ferro-ioni liberi⁸⁸, come ad esempio in corso di emoglobinuria, mioglobinuria o nefrotossicità da gentamicina e cisplatino. Quando sono generati, i ROS possono danneggiare le cellule in diversi modi: provocando l'ossidazione delle proteine di membrana, la perossidazione dei lipidi o danneggiando direttamente il DNA. Vari studi in modelli animali hanno evidenziato il ruolo protettivo della somministrazione di antiossidanti, ma questi dati non sono sempre stati confermati⁸⁹⁻⁹⁴. I risultati contraddittori potrebbero essere dovuti a variabili non standardizzate come la durata dell'insulto e il momento dell'intervento. Purtroppo, trials clinici controllati su pazienti affetti da NTA non sono ancora

stati effettuati, ma l'uso degli antiossidanti potrebbe essere promettente anche nel trattamento della NTA stabilizzata. Il razionale di questo approccio risiede nel ruolo che esercitano i polimorfonucleati neutrofili, richiamati in sede durante la riperfusione⁹⁵, nell'amplificare il danno renale (danno da ischemia-riperfusione). I PMN attivati aderiscono prima blandamente all'endotelio tramite la P-selectina, poi tenacemente tramite le molecole di adesione CD11/18 e il recettore ICAM-1, provocando un danno diretto endoteliale e tubulare mediato dal rilascio di una vasta gamma di ROS. In alcuni modelli sperimentali, la deplezione dei neutrofili o l'inibizione della loro adesione alle cellule endoteliali (attraverso la somministrazione del ligando selectina-P solubile oppure di anticorpi neutralizzanti ICAM-1 o CD11/18) riduce significativamente il danno ischemico e/o tossico renale⁹⁵.

Indipendentemente dai meccanismi patogenetici cellulari e molecolari, la NTA è caratterizzata, sia nei modelli animali che nell'uomo, da una notevole eterogeneità della risposta morfologica dei vari segmenti del nefrone. Le cellule che rivestono i dotti collettori della midollare interna ed i tratti corticali dell'ansa ascendente spesso risultano frequentemente indenni. Invece, i tubuli prossimali ed il tratto midollare spesso dell'ansa di Henle presentano sempre delle alterazioni, anche se proporzionali al grado di severità del danno. La necrosi franca è relativamente infrequente nella NTA ischemica, mentre può essere estesa nella NTA tossica, specialmente in quella indotta da metalli pesanti⁹⁶.

La fase di recupero, dal punto di vista istologico, è caratterizzata dalla ricomparsa della polarità cellulare e dell'integrità dei tight-junctions nelle cellule danneggiate ma sopravvissute, dalla scomparsa dei detriti cellulari e dei frammenti apoptotici,

dalla rimozione dei cilindri intraluminari e dalla rigenerazione delle cellule tubulari perdute⁹⁷. Questa fase è caratterizzata dalla aumentata espressione di geni in risposta allo stress e all'accumulo di mononucleati nel tubulo. Subito dopo l'induzione del danno, molte cellule tubulari quiescenti entrano nel ciclo cellulare: queste cellule possono sia riparare il danno, sia entrare in un pathway di morte cellulare. Questo punto di decisione è regolato finemente da inibitori chinasi ciclo-dipendenti come p21⁹⁸. Un importante ruolo nella proliferazione tubulare è rivestito da numerosi fattori di crescita quali EGF, IGF-1, FGF, HGF, per i quali si osserva un marcato incremento dei livelli di mRNA. Negli animali affetti da NTA, la somministrazione dei fattori sopra menzionati si è dimostrata efficace nell'accelerare il recupero⁹⁹⁻¹⁰¹. Trials clinici controllati, ove i fattori di crescita fanno parte del regime terapeutico dei pazienti con NTA, sono attualmente in corso⁹⁸.

La fase di recupero può durare da pochi giorni a circa un mese ed è seguita spesso da completo recupero della funzione renale. Tuttavia in alcuni casi di NTA può residuare una riduzione permanente del filtrato glomerulare o di qualche funzione tubulare.

Concludendo, si può affermare che la NTA rappresenta un importante modello di danno renale, ma che finora lo studio dei fattori in grado di contrastare l'amplificazione del danno, che si protrae anche dopo la rimozione dell'insulto, non ha dato risposte concrete. Nella NTA sperimentale stabilizzata, la maggior parte degli agenti testati ha dato esiti contrastanti od insignificanti. È per questo motivo che, negli ultimi anni, l'attenzione si è spostata sempre di più verso la fase di recupero e verso i fattori in grado di attivare il processo rigenerativo. A questo

proposito, le cellule staminali sono uno strumento promettente, in quanto potrebbero consentire di superare senza conseguenze gli episodi di IRA organica.

MATERIALI E METODI

Anticorpi. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi (Abs): anti-CD24 mAb (SN3), anti-WT1 mAb (F6), anti-megalin mAb (H-245), anti-Oct-4 pAb (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-Bmi-1 mAb (F6) (Upstate, Temecula, CA), anti-Nanog pAb, anti-Sodium Channel beta pAb (AbCam, Cambridge, UK), anti-CD133/2 mAb (293C3), (PE-conjugated anti CD133/2 mAb (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), E-cadherin mAb (36), rat anti-mouse CD31 mAb (MEC 13.3), APC-conjugated anti-CD34 mAb (8G12), PerCP-conjugated anti-CD45 mAb (2D1), FITC-conjugated anti-CD44 mAb (L178), PE-conjugated mouse anti-human IgG1 (MOPC-21) ed anti-IgG2b (MPC-11) (BD Biosciences, San Diego, CA), anti-human HLA-I mAb (W6/32), anti- α SMA mAb (1A4) (Sigma-Aldrich, SanLouis, MO, USA), anti-vWf pAb, anti-calponin mAb (cALP), anti-smooth muscle myosin heavy chain mAb (SMMS-1) (Dako, Glostrup, Denmark), PE-conjugated anti-CD106 mAb (1G11B1), PE-conjugated anti-CD54 mAb (Southern Biotech, Birmingham, AL), FITC-conjugated anti-CD29 mAb (4B7R, Ancell Corporation, Bayport, MN). L'anticorpo anti-LAP (TGF- β 1) mAb (clone 27232) è stato acquistato dalla R&D Systems (Minneapolis, MN). L'anticorpo anti-THG goat pAb è stato acquistato dalla MP Biomedicals, Verona, Italy. L'anticorpo anti-LAP (TGF- β 1) mAb (clone 27232) è stato acquistato dalla R&D Systems (Minneapolis, MN). L'anticorpo anti-THG

goat pAb è stato acquistato dalla MP Biomedicals, Verona, Italy. Gli anticorpi secondari Alexa Fluor® 488-, 546-, 633-labelled goat anti-mouse IgG1, Alexa Fluor® 488-, 546-labelled goat anti-mouse IgG2a, Alexa Fluor® 546 and 488-labelled goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor® 488 and 546-labelled goat anti-mouse IgG2b or Alexa Fluor® 546-labelled rabbit anti-goat IgG Abs, sono stati acquistati dalla Molecular Probes, Eugene, OR.

Tessuti. Reni embrionali di età gestazionale compresa tra 8.5 e 17 settimane sono stati ottenuti da 17 pazienti che si sono sottoposte ad interruzione terapeutica o volontaria di gravidanza. L'interruzione di gravidanza è stata eseguita secondo le normative vigenti in ospedali pubblici autorizzati ed ogni paziente ha fornito un consenso informato scritto. L'utilizzo di tessuti fetali umani ai fini della ricerca scientifica è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze, Italia (protocollo n° 6783-04).

Frammenti di tessuto renale microscopicamente normale sono stati ottenuti da 10 pazienti adulti affetti da neoplasie renali localizzate, che si erano sottoposti a nefrectomia radicale. Tutte le procedure sono state effettuate secondo le indicazioni del Comitato Etico per le sperimentazioni sull'uomo, ed ogni paziente aveva precedentemente fornito il proprio consenso informato scritto.

Isolamento e coltura delle cellule embrionali CD24+CD133+. Per ottenere le cellule embrionali CD24+CD133+, i reni embrionali umani sono stati sminuzzati e digeriti con Collagenasi IV (500U/ml) per 20 minuti a 37°C. La sospensione di tessuto renale embrionale è stata successivamente raccolta e valutata per

l'espressione di CD133 e CD24 mediante analisi citofluorimetrica. Il CD133 è stato evidenziato mediante l'utilizzo di un anticorpo PE-conjugated anti CD133/2 mAb combinato con un anti CD24 mAb (IgG1) seguito da un secondario Alexa Fluor® 633-labelled goat anti-mouse IgG1. Poiché le cellule CD133+ rappresentavano una sottopopolazione di cellule CD24+, le cellule CD24+CD133+ sono state isolate mediante il CD133 Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH)⁵, in conformità con le istruzioni del produttore. La frazione di cellule positive risultava essere costituita per oltre il 99% da cellule CD24+CD133+, le quali sono state successivamente ripiastrate in EGM-MV (Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ) supplementato con il 20% di FBS (Hyclone, Celbio, Milano, Italia) e successivamente utilizzate per il clonaggio.

La generazione dei cloni, a partire dal pool di cellule CD24+CD133+, è stata ottenuta mediante diluizione limite in piastre da 96 pozzetti contenenti EGM-MV 20% FBS. Due ore dopo la piastratura, i pozzetti contenenti soltanto una cellula sono stati identificati mediante analisi al microscopio invertito ed evidenziati. Piastrando 1800 cellule renali embrionali CD24+CD133+ derivati da 5 diversi donatori sono state ottenute 518 singole cellule. È stato ottenuto un numero totale di 212 cloni di cui 29 sono stati successivamente raccolti ed analizzati. Le cellule embrionali CD24+CD133+ sono state tenute in coltura anche come *bulk*, ed espanse regolarmente mediante vari passaggi in coltura. Il medium è stato cambiato per 2 volte a settimana. La conta cellulare e il fattore di diluizione sono stati registrati ad ogni passaggio. Tutte queste operazioni sono state ripetute per un periodo di 4 mesi. Il numero di raddoppiamenti della popolazione (*Population Doublings* o PD) è stato calcolato sulla base della seguente equazione: n° di PD =

$\log_2(N_i/N_0)$, dove N_i rappresenta il numero di cellule ottenute e N_0 rappresenta il numero di cellule piastrate.

Culture Cellulari. Per ottenere le cellule APEMP, la corticale renale è stata separata dalla midollare e digerita meccanicamente; i glomeruli sono stati isolati mediante separazione su setacci di maglia graduata (trama 60, 80, 150 μm). La sospensione glomerulare capsulata è stata raccolta dall'ultimo setaccio, lavata con EGM-MV (Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ) senza siero, quindi posta su una piastra di coltura ricoperta di fibronectina umana (10 $\mu\text{g/ml}$, Sigma Aldrich) ad una densità di 200 glomeruli/piastra 100mm e mantenuta in medium EGM-MV supplementato con il 20% di FBS (Hyclone, Celbio, Milano, Italia). Per mantenere integra la capsula di Bowman, non è stata effettuata alcuna digestione enzimatica. Dopo 4-5 giorni di coltura, i glomeruli isolati hanno aderito alla piastra e hanno dato origine a un outgrowth cellulare. I glomeruli sono stati staccati e le cellule aderenti sono stati messe in coltura come bulk.

Le cellule mesangiali umane (*Human Mesangial Cells* o HMC) sono state ottenute da reni macroscopicamente normali prelevati da pazienti con tumori renali localizzati, sottoposti a nefrectomia radicale, come descritto precedentemente⁵.

Microscopia Confocale. La microscopia confocale è stata effettuata su sezioni dello spessore di 5 μm di tessuto renale congelato, o su cellule coltivate su vetrino (*Chamber Slides*, Vector Laboratories, Burlingame, CA), utilizzando un sistema

di microscopia confocale Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss; Jena, Germania), come precedentemente descritto⁵.

Real-Time Quantitative RT-PCR. L'RNA totale è stato estratto utilizzando un kit disponibile in commercio (Micro kit RNeasy, Qiagen; Hilden, Germania) ed è stato trattato con DNasi 1 (Qiagen) al fine di eliminare la possibile contaminazione da DNA genomico. La Real-Time Quantitative RT-PCR secondo il metodo Taq-Man è stata eseguita come descritto in precedenza^{5,102,103}. Per la quantizzazione dell'espressione dei geni codificanti per il BmI-1, lo Scambiatore Na/H, l'Aminopeptidasi A, il Cotrasportatore Na/Gluc1, la Gamma-Glutamil Transferasi (γ -GT), l'Acquaporina 1 (AQP1), l'Acquaporina 3 (AQP3), il Cotrasportatore Na/Cl sensibile ai diuretici tiazidici, la Calbindina D-28k, il Canale β del Na (ENaC- β), il Runx-2, l'Osteopontina, la Fosfatasi Alcalina (AP), l'Adiponectina, il PPAR- γ , il KDR, il Tie-2, la VE-cadherina, l'actina- α del muscolo liscio (*α -smooth muscle actin* o α -SMA), la Calponina e l'Elastina sono stati utilizzati kit Assay on Demand (Applied Biosystems, Warrington, UK). I livelli di mRNA sono stati quantificati confrontando i risultati sperimentali con curve standard costruite usando diluizioni in serie di un campione positivo.

La quantizzazione dell'espressione dei geni codificanti per il fattore di von Willebrandt (vWf), l'Oct-4 ed il Nanog è stata eseguita come descritto in precedenza^{5,102,103}.

Citometria a Flusso. L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita come descritto in precedenza⁵. In particolare, dopo la saturazione dei siti di legame non specifici

con immunoglobuline IgG di coniglio, le cellule da analizzare sono state incubate per 20 minuti in ghiaccio con anticorpi specifici o con un isotipo di controllo; nella marcatura indiretta, questo passaggio è stato seguito da una seconda incubazione in ghiaccio con un appropriato anticorpo secondario anti-isotipo coniugato ad un fluorocromo. Infine, le cellule sono state lavate e analizzate con citofluorimetro BD LSRII ed i risultati ottenuti sono stati analizzati con il software DIVA (BD Biosciences). È stato acquisito un totale di 10^4 eventi per ciascun campione.

Immunoistochimica. Per l'immunoistochimica, sezioni di 5 μm di tessuto renale congelato sono state fissate in PFA al 4% a temperatura ambiente per 20 minuti. Dopo una preincubazione di 30 minuti con siero di cavallo (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) le sezioni sono state incubate per 30 minuti con un anticorpo monoclonale anti-citocheratina (Sigma-Aldrich), successivamente con un anticorpo biotinilato anti-mouse e infine con un complesso avidina-biotina-perossidasi (Vectastain ABC kit). Le sezioni sono state successivamente esposte ad una soluzione 0.3% di idrogeno-perossido-metanolo per inibire l'attività endogena della perossidasi. Come substrato per la perossidasi, è stato utilizzato il Vector SG (Vector Laboratories). Le sezioni sono state poi incubate con un anticorpo monoclonale anti HLA-I (Sigma-Aldrich), seguito da un anticorpo biotinilato anti-mouse, e dal complesso avidina-biotina-perossidasi (Vectastain ABC kit). Come substrato per la perossidasi è stato utilizzato il 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma Aldrich). Infine, le sezioni sono state montate con Kaiser's glycerol gelatine (Merck). Tutte le incubazioni sono state effettuate a temperatura

ambiente. Come controllo negativo l'anticorpo primario è stato omesso o sostituito con una soluzione di ascite di topo.

Differenziazione *in vitro*. La differenziazione tubulogenica è stata ottenuta coltivando le cellule renali embrionali CD24⁺CD133⁺ per 30 giorni in medium REGM, disponibile in commercio, contenente le SingleQuotes (idrocortisone, hEGF, FBS, epinefrina, insulina, triiodotironina, transferrina e gentamicina/amfotericina-B) (Cambrex Bio Science) e supplementato con 50 ng/ml di fattore di crescita epatocitario (HGF, Peprotech, Rocky Hill, NJ). Il mezzo è stato cambiato due volte a settimana.

Per la differenziazione osteogenica, le cellule renali embrionali CD24⁺CD133⁺ sono state coltivate in α -MEM, 10% Horse serum, contenente desametasone 100 nM, acido ascorbico 50 μ M e β -glicerofosfato 2 mM (tutto Sigma-Aldrich). Il medium è stato cambiato 2 volte a settimana per 3 settimane.

Per la differenziazione adipogenica, le cellule CD24⁺CD133⁺REC sono state incubate in DMEM hg (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contenente 10% FBS, desametasone 1 μ M, IBMX 0.5 μ M, insulina 10 μ g/ml e indometacina 100 μ M (tutto Sigma-Aldrich). Dopo 72 h, il medium è stato sostituito con DMEM hg, 10% FBS e insulina 10 μ g/ml per 24 h. Questi trattamenti sono stati ripetuti per 3 volte. Le cellule quindi sono state mantenute in DMEM hg, 10% FBS e insulina 10 μ g/ml per un'altra settimana.

Per la differenziazione endoteliale le cellule CD24⁺CD133⁺REC sono state coltivate in presenza del medium EGM2-MV, disponibile in commercio, contenente le SingleQuotes (idrocortisone, hFGF, FBS, R³-IGF, VEGF, hEGF,

acido ascorbico, GA-1000) (Cambrex Bio Science) e ulteriormente supplementato con il fattore di crescita vascolare VEGF 100 ng/ml (Peprotech), mantenuto per 14 giorni. Il medium è stato cambiato 2 volte a settimana per 2 settimane.

Per la differenziazione stromale le cellule renali embrionali CD24⁺CD133⁺ sono state incubate con medium α -MEM (Sigma-Aldrich) 10% FBS (Hyclone, Celbio) supplementato con TGF- β (Peprotech) 5 ng/ml per 21 giorni, cambiando il medium 2 volte la settimana per 3 settimane.

Colorazioni Istochimiche.

COLORAZIONE CON FOSFATASI ALCALINA.

Dopo differenziazione tubulare e osteogenica le cellule sono state colorate con una soluzione istochimica Magenta per la fosfatasi alcalina (Sigma-Aldrich) secondo le istruzioni del produttore.

COLORAZIONE CON ALIZARIN RED E OIL RED O.

Al termine della differenziazione osteogenica, per rilevare i depositi di calcio intracellulari, le cellule sono state fissate con formalina al 10% e colorate con Alizarin Red soluzione al 2% (Sigma Aldrich) per 3 minuti, seguito da lavaggio accurato e colorazione con ematossilina.

Al termine del trattamento adipogenico, i vacuoli lipidici sono stati colorati con Oil red O (Sigma-Aldrich). In breve le cellule sono state lavate con PBS, fissate con formalina al 10% per 30 minuti, risciacquate con isopropanolo al 60% e incubate con Oil red O 0.1% per 5 minuti. Dopo il risciacquo in acqua, le cellule sono state controcolorate con ematossilina.

Differenziazione *in vivo*. Per valutare se le cellule embrionali renali CD24+CD133+ fossero in grado di differenziare *in vivo* in cellule endoteliali, le cellule sono state coltivate in medium per il differenziamento endoteliale e dopo 21 giorni 1×10^6 cellule sono state marcate con colorante sopravvital PKH26 Red Fluorescence Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich), risospese in 50 μ l di EBM (Cambrex Bio Science) supplementato ulteriormente con 50 μ l di Matrigel (Becton Dickinson) a +4°C, ed inoculate sottocute a livello dei fianchi di quattro topi SCID (Harlan, Udine, Italy). Quindici giorni dopo i topi sono stati sacrificati e le masserelle di Matrigel sono state recuperate ed analizzate in microscopia confocale per l'espressione del fattore di von Willebrandt (vWf).

Topi. Topi C.B-17/IcrHsd-*Prkdc^{scid}* (SCID) femmine, di età 7 settimane e peso 18-20 grammi (Harlan Italy, Udine) sono stati mantenuti, in condizioni conformi al Decreto Legislativo 116/92, nello stabulario Cesal dell'Università degli Studi di Firenze, in appositi armadi ventilati per animali immunodeficienti, e approvvigionati giornalmente di cibo e acqua sterili.

Xenotrapianto in un modello di necrosi tubulare acuta indotta da glicerolo in topi SCID. I modelli di insufficienza renale acuta conseguente a rabdomiolisi indotta da glicerolo e l'inoculo di cellule renali embrionali (*renal embryonic cells* o REC) CD24+CD133+, HMC o soluzione fisiologica sono state eseguite come descritto in precedenza^{5,104}.

Gli esperimenti sugli animali sono stati eseguiti in accordo con le linee guida istituzionali, regionali e statali e secondo le linee guida del National Institutes of Health per la stabulazione e l'utilizzo degli animali da laboratorio.

In particolare, per l'induzione di necrosi tubulare acuta rabdomiolisi-indotta, gruppi di topi SCID (Harlan) sono stati anestetizzati con una soluzione di Cloralio Idrato (Sigma-Aldrich) per via intra-peritoneale (400 mg/kg di peso corporeo), utilizzando aghi da 26 Gauge, e successivamente hanno ricevuto una iniezione intramuscolo di glicerolo ipertonico (8 ml/kg di peso corporeo di una soluzione al 50%, Sigma-Aldrich), utilizzando aghi da 30 Gauge. Il glicerolo è stato somministrato, in due dosi equamente divise, in entrambi gli arti inferiori di ciascun topo.

Due gruppi di topi 3 e 4 giorni dopo la somministrazione del glicerolo hanno ricevuto un'inoculo *e.v.* nella vena della coda come di seguito descritto: Gruppo 1, soluzione fisiologica ($n = 32$); e Gruppo 2, CD24+CD133+REC ($n = 32$; 0.75×10^6 al giorno 3 e 0.75×10^6 al giorno 4) ottenute da cinque differenti donatori umani, precedentemente marcate con PKH26. Gli animali sono stati sacrificati a differenti intervalli di tempo (giorni 3, 7, 11, e 14), e sono stati prelevati i campioni di siero per la determinazione del BUN. I livelli di BUN sono stati misurati in sangue eparinato mediante Aeroset c8000 test (Abbott, Wiesbaden, Germany). Livelli di BUN superiori a 40 mg/dl sono stati considerati anormali. I *range* di normalità nei nostri esperimenti erano compresi tra 30 e 37 mg/dl, come stimato in altri 16 topi non trattati e con normale funzione renale (giorno 0). Un ulteriore gruppo di topi ($n = 8$) ha ricevuto un'inoculo *e.v.* nella vena della coda di HMC (0.75×10^6 al giorno 3 e 0.75×10^6 al giorno 4), precedentemente marcate

con PKH26 ed ottenute da tre donatori umani. I topi sono stati sacrificati dopo 10 giorni (giorno 14) ed i livelli di BUN sono stati valutati come prima descritto. In tutti i gruppi sperimentali sono stati raccolti i reni.

In altri esperimenti, dopo l'inoculo intramuscolo di glicerolo ipertonico (giorno 0), due gruppi di topi hanno ricevuto degli inoculi endovena al giorno 0 come di seguito descritto: Gruppo 1, soluzione fisiologica ($n = 24$ topi); Gruppo 2, CD24+CD133+REC ($n = 24$ topi; 0.75×10^6 cellule 4 ore dopo l'inoculo del glicerolo e 0.75×10^6 cellule 24 ore dopo l'inoculo del glicerolo) ottenute da due differenti donatori umani e marcate con PKH26 immediatamente prima dell'iniezione. Per ogni punto di osservazione (giorni 4, 6 and 14) e per ogni gruppo di trattamento sono stati sacrificati otto topi, dai quali sono stati raccolti i campioni di siero per la misurazione del BUN, come descritto in precedenza. Inoltre, in tutti i gruppi sperimentali sono stati raccolti i reni.

In 10 topi è stata esaminata la proliferazione cellulare in risposta al danno tubulare dopo l'inoculo del glicerolo con la BromodesossiUridina (BrdU). Dopo l'inoculo intramuscolo di glicerolo ipertonico (giorno 0), i topi hanno ricevuto un'inoculo *e.v.* di CD24+CD133+ REC marcate con PKH26 (0.75×10^6 cellule 4 ore dopo l'inoculo del glicerolo e 0.75×10^6 cellule 24 ore dopo l'inoculo del glicerolo). I topi hanno ricevuto una singola dose di BrdU (100 mg/kg) intraperitoneo ogni giorno e sono stati sacrificati ai giorni 4, 5 e 6, un'ora dopo l'inoculo di BrdU. La BrdU è stata rilevata con un anticorpo monoclonale anti-BrdU (Sigma). Le sezioni sono state incubate in una soluzione HCl 2N a 37°C per 1 ora, quindi tamponate con una soluzione di Borato di Sodio 0.1 M, pH 8.5, seguita dall'incubazione in PBS.

Morfologia Renale. Sezioni di tessuto renale dello spessore di 5 μm , ottenute da topi sacrificati al giorno 14 dopo l'inoculo del glicerolo, sono state fissate in etanolo e colorate con Acido Periodico e Reattivo di Schiff (PAS) (Carlo Erba, Milan, Italy) e con la Tricromica di Masson (Bio-Optica, Milan, Italy) per valutare il grado di fibrosi dell'interstizio della corticale renale. Campi di osservazione non sovrapposti (più di 20 per ogni topo) sono stati osservati ad alto ingrandimento utilizzando un obiettivo 20x da due osservatori indipendenti. La colorazione PAS è stata eseguita per valutare l'atrofia tubulare. I tubuli atrofici sono stati identificati in base all'ispessimento delle membrane basali tubulari ed è stato assegnato un punteggio da 0 a 3 in relazione alla percentuale di tubuli coinvolti: 0 = nessun tubulo coinvolto; 1= meno del 30%; 2= dal 30% al 60%; 3= più del 60% di tubuli atrofici.

La severità della cicatrice interstiziale è stata valutata sulle sezioni colorate con la Tricromica di Masson. Il tubulo-interstizio normale è stato valutato 0; l'atrofia tubulare di grado medio con edema interstiziale o fibrosi in meno del 25% dell'area osservata è stata valutata 1; l'atrofia tubulare di grado moderato associata ad edema interstiziale o fibrosi dal 25% al 50% dell'area osservata è stata valutata 2; l'atrofia tubulare di grado severo con edema interstiziale o fibrosi in più del 50% dell'area osservata è stata valutata 3.

Sezioni di tessuto renale dello spessore di 5 μm ottenute da topi sacrificati al giorno 4 dopo l'inoculo del glicerolo sono state fissate in etanolo e colorate con Ematossilina ed Eosina (Bio-Optica) e PAS (Carlo Erba) per valutare le seguenti modificazioni: cilindri ialini intraluminari, degenerazione delle cellule tubulari (vacuolizzazione citoplasmatica, rigonfiamento, appiattimento cellulare, goccioline

PAS-positive, frammentazione nucleare, detriti cellulari) e perdita cellulare (denudazione della membrana basale tubulare). Campi di osservazione non sovrapposti (più di 20 per ogni topo) sono stati osservati ad alto ingrandimento utilizzando un obiettivo 20x. Le lesioni avevano una distribuzione focale e sono state valutate con un punteggio da 0 a 3 come di seguito riportato: 0= nessun cambiamento; 1= sporadico riscontro di lesioni tubulari; 2= lesioni più evidenti riguardanti una minima percentuale di tubuli per ogni area colpita; 3= lesioni presenti nella maggior parte dei tubuli all'interno delle aree colpite. Tutte le sezioni sono state analizzate dallo stesso patologo in singolo cieco.

Valutazione della tumorigenicità. Per la valutazione della tumorigenicità delle CD24+CD133+ REC, dieci topi NOD/SCID di 8 settimane (Harlan) sono stati trattati con un'inoculo sottocute di 1.5×10^6 cellule ottenute da tre diversi donatori e risospese in 200 μ l di EBM per ogni fianco. La crescita tumorale è stata valutata due volte alla settimana per tre mesi.

Analisi Statistica. I dati sono stati espressi come media \pm errore standard della media (SEM). Il confronto tra gruppi è stato eseguito con Mann-Whitney test o con Wilcoxon test per le variabili non parametriche, come ritenuto più opportuno. È stato considerato statisticamente significativo un valore di $P < 0.05$.

RISULTATI

I reni embrionali umani contengono un alto numero di cellule CD24+CD133+ selettivamente localizzate nel mesenchima metanefrico, che progressivamente diminuiscono nel corso del differenziamento del rene

La sospensione delle cellule totali ottenute da reni embrionali umani di un'età gestazionale compresa tra 8.5 e 9 settimane, analizzata in citofluorimetria, conteneva una popolazione di cellule che co-esprimevano sia il CD24 che il CD133 in percentuale variabile tra il 35% ed il 50% (Figura 1A, sinistra). Nei reni embrionali tra 12 e 17 settimane di età gestazionale, la percentuale di cellule doppie positive CD24+CD133+ REC si riduceva significativamente al 10-20% (Figura 1A, centro), mentre queste rappresentavano solo lo 0.5-3% di tutte le cellule ottenute dalla corticale di reni umani adulti (Figura 1A, destra).

La localizzazione delle CD24+CD133+ REC nei reni embrionali umani di età compresa fra 8.5 e 17 settimane di gestazione è stata successivamente investigata mediante microscopia confocale. Il CD24 era fortemente espresso su tutte le strutture derivate dal mesenchima metanefrico (MM) e nella gemma ureterale (UB) (Figura 1, B e C). Era interessante osservare che a tutti gli stadi di differenziamento del rene embrionale, l'espressione del CD133 era limitata soltanto ad un *subset* di cellule CD24+ (Figura 1, B e C). La doppia marcatura per CD133 ed E-Cadherin, che evidenzia in modo specifico l'epitelio della UB e le

sue diramazioni, dimostrava che l'espressione del CD133 era limitata soltanto alle strutture primordiali derivate dal MM (Figura 1D). La doppia marcatura per CD133 e per il *marker* del tubulo prossimale *Lotus Tetragonolobus Lectin* (LTA) dimostrava che soltanto le strutture immature, che erano negative o soltanto debolmente positive per LTA, esprimevano il CD133 (Figure 1E). Quando le cellule acquisivano *markers* di differenziamento ed esprimevano LTA ad alta intensità, l'espressione del CD133 era assente (Figure 1E). Tra le strutture derivate dal MM, le vescicole primarie (*Primary Vesicles* o PV) (Figura 2A), i corpuscoli a forma di virgola (*Comma-Shaped Bodies* o C-SB) (dati non mostrati), ed i corpuscoli a forma di S (*S-Shaped Bodies* o S-SB) (Figura 2, B e C) esprimevano il CD133.

Negli *S-Shaped Bodies* un'intensa espressione di CD133 si osservava, sia a livello dell'ansa prossimale, segmento che avrebbe dato origine ai podociti (rima epiteliale interna) ed alle cellule epiteliali della capsula di Bowman (rima epiteliale esterna) nel glomerulo primitivo, come evidenziato dall'espressione di WT-1 (Figura 2B), sia a livello del segmento distale (Figura 2, B e C). Comunque, quando all'interno dell'area a forma di calice del glomerulo primitivo si rendeva evidente un'iniziale matassa vascolare, il CD133 era evidenziabile solo a livello delle cellule epiteliali parietali della capsula di Bowman (Figura 2D). Nei glomeruli maturi, il CD133 persisteva preferenzialmente in un *subset* di cellule della capsula di Bowman localizzate all'opposto del polo vascolare (Figura 2E). Infine, nei glomeruli maturi, il CD133 restava selettivamente confinato alle cellule epiteliali parietali della capsula di Bowman localizzate a livello del polo urinifero (Figura 2F).

Figura 1

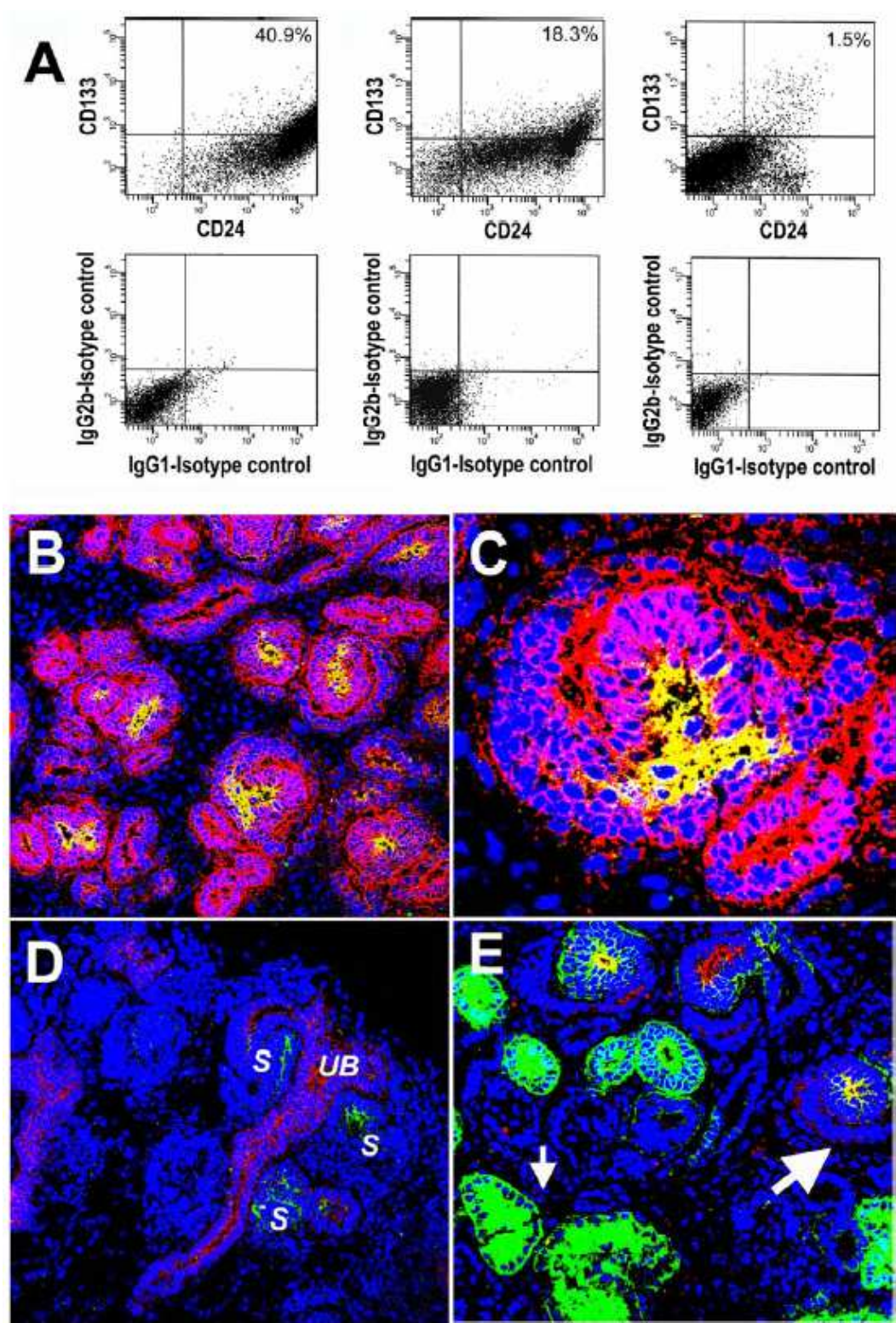


Figura 1. CD133 e CD24 co-localizzano selettivamente nelle aree più precoci di sviluppo del mesenchima metanefrico indotto durante l'embriogenesi renale.

(A) Espressione di CD24 e CD133 in una sospensione cellulare totale di rene embrionale con un'età gestazionale di 8.5 settimane (in alto a sinistra) o di 12.5 settimane (in alto al centro) o di un rene umano adulto (in alto a destra) (Analisi citofluorimetrica). Gli stessi campioni marcati con il controllo isotipico hanno dato risultato negativo (in basso).

(B) L'immunofluorescenza doppia per CD24 e CD133 mostra che il CD24 (rosso) marca sia le strutture derivate dal MM che dall'UB, mentre il CD133 (verde) co-localizza selettivamente un *subset* di cellule CD24-positive (il giallo indica il segnale di co-localizzazione).

(C) Alto ingrandimento di una struttura renale primordiale mostrata in B, che co-esprime sia CD24 (rosso) che CD133 (verde). Il giallo indica il segnale di co-localizzazione.

(D) L'immunofluorescenza doppia per CD133 (verde) ed E-cadherin (rosso), che marca intensamente l'epitelio dell'UB e le sue diramazioni, evidenzia l'espressione del CD133 soltanto nelle strutture primordiali derivate dal MM condensato. *S*, *S-shaped body*.

(E) L'immunofluorescenza doppia per CD133 (rosso) ed LTA (verde) dimostra che solo le strutture immature derivate dal MM, che sono negative o solo debolmente positive per LTA, esprimono CD133. La freccia piccola indica strutture del tubulo prossimale maturo; la freccia grande indica un *S-shaped body* CD133-positivo.

Il To-pro-3 evidenzia tutti i nuclei in blu. Ingrandimento: x20 in B, D ed E (zoom 1.1); x40 in C (zoom 1.3).

Figura 2

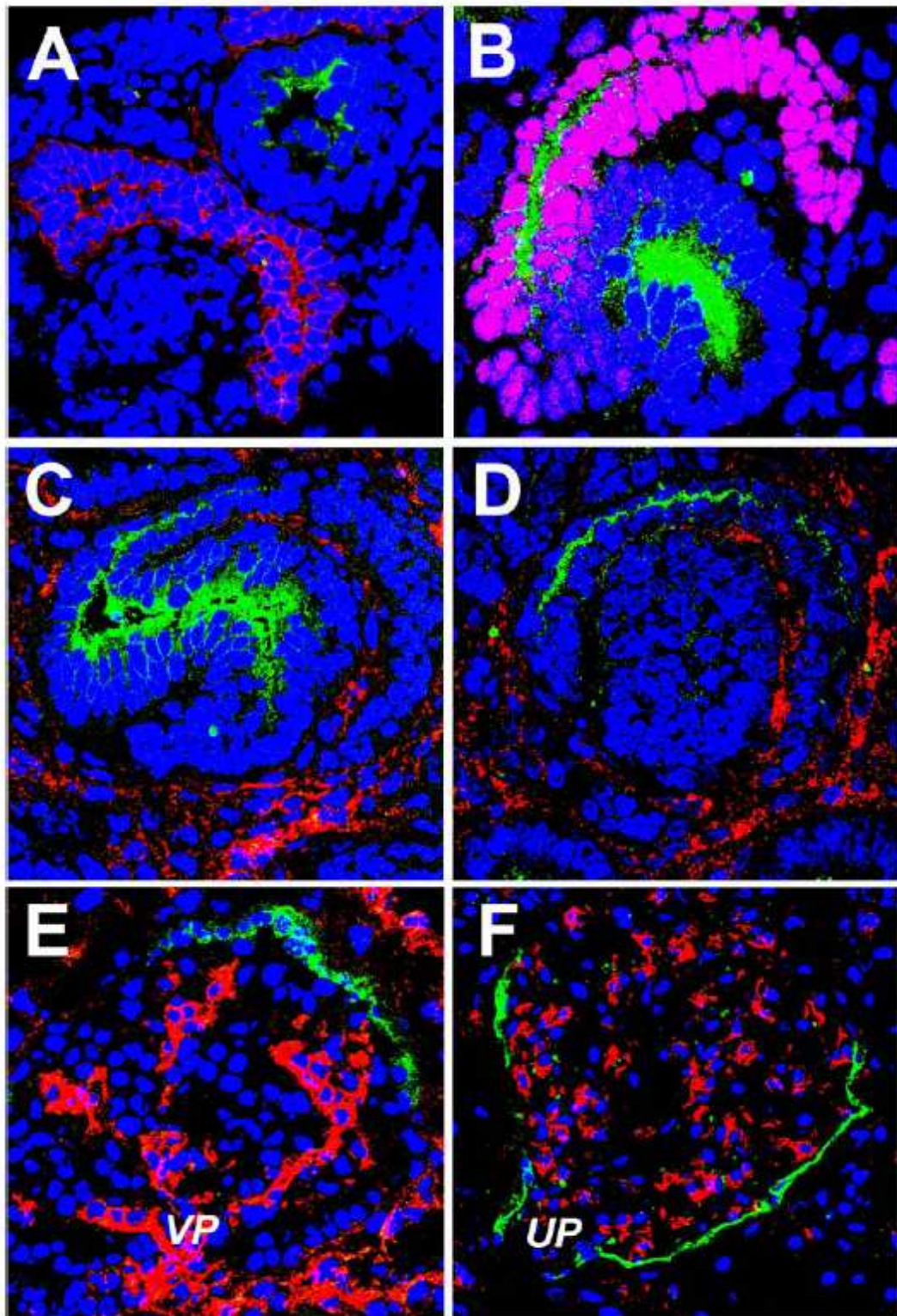


Figura 2. Le CD24+CD133+REC si localizzano a livello delle vescicole renali e dei corpuscoli a forma di S (*S-shaped bodies*), mentre restano confinate al polo urinifero della capsula di Bowman durante lo sviluppo del glomerulo.

(A) L'immunofluorescenza doppia per CD133 (verde) ed E-cadherin (rosso) mostra l'espressione del CD133 in una vescicola primaria, ma non nell'UB.

(B) L'immunofluorescenza doppia per WT-1 (rosso) e CD133 (verde) mostra che nel *S-shaped body* il CD133 è espresso nell'ansa prossimale (evidenziata dalla positività al WT-1), come anche nell'ansa distale. Il segnale di co-localizzazione tra WT-1 (rosso) e To-pro-3 (blu) è in rosa.

(C) L'immunofluorescenza doppia per vWf (rosso) e CD133 (verde) mostra che in un *S-shaped body*, dopo la colonizzazione da parte dei capillari primordiali positivi al vWf (rosso), il CD133 è ancora espresso diffusamente

(D) L'immunofluorescenza doppia per vWf (rosso) e CD133 (verde) mostra che, quando i glomeruli sono in uno stadio di sviluppo molto precoce delle anse capillari, il CD133 è espresso selettivamente da un *subset* di cellule nella capsula di Bowman (verde)

(E) L'immunofluorescenza doppia per vWf (rosso) e CD133 (verde) mostra che nel glomerulo maturo, il CD133 persiste selettivamente in un *subset* di cellule nella capsula di Bowman (verde) localizzato all'opposto del polo vascolare (VP)

(F) L'immunofluorescenza doppia per vWf (rosso) e CD133 (verde) mostra che nel glomerulo maturo, il CD133 persiste selettivamente in un *subset* di cellule nella capsula di Bowman (verde) localizzato al polo urinifero (UP)

Il To-pro-3 evidenzia tutti i nuclei in blu. Ingrandimento: x40 in A (zoom 1.1), B (zoom 1.3), C (zoom 1.3), D (zoom 1.3) ed E (zoom 1.1); x20 in F (zoom 1.9).

Le CD24+CD133+REC mostrano gli stessi markers fenotipici delle APEMP e manifestano sia capacità di autorinnovamento che di multidifferenziamento

Le CD24+CD133+REC sono state recuperate da una sospensione di cellule totali di rene embrionale digerito con Collagenasi IV, mediante selezione immunomagnetica. L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato che questa popolazione esprimeva omogeneamente, non soltanto il CD24 ed il CD133, ma anche il CD106, il CD44, il CD54 ed il CD29, mentre i *markers* ematopoietici CD34 e CD45 non erano rilevabili (Figura 3A). Le CD24+CD133+REC recuperate potevano essere espanse in coltura per 60-80 cicli di raddoppiamento della popolazione (*Population Doublings* o PD) per un periodo di 4 mesi (Figura 3B). Se valutate a 80 PD, le cellule mostravano un contenuto di DNA euploide (Figura 3C). Le CD24+CD133+REC in coltura esprimevano alti livelli di RNA messaggero (mRNA) per Bmi-1, Oct-4 e Nanog, a livelli anche più alti delle APEMP, mentre nelle HMC si rinvenivano livelli irrilevanti degli stessi fattori di trascrizione specifici delle cellule staminali (*Stem Cells* o SC) (Figura 3D) (30,31). L'espressione di Bmi-1, Oct-4 e Nanog è stata valutata anche a livello di proteina nei reni fetali umani. L'immunofluorescenza doppia ha dimostrato *in vivo* l'espressione di Bmi-1, Oct-4 e Nanog da parte delle CD24+CD133+REC (Figura 3E).

Figura 3

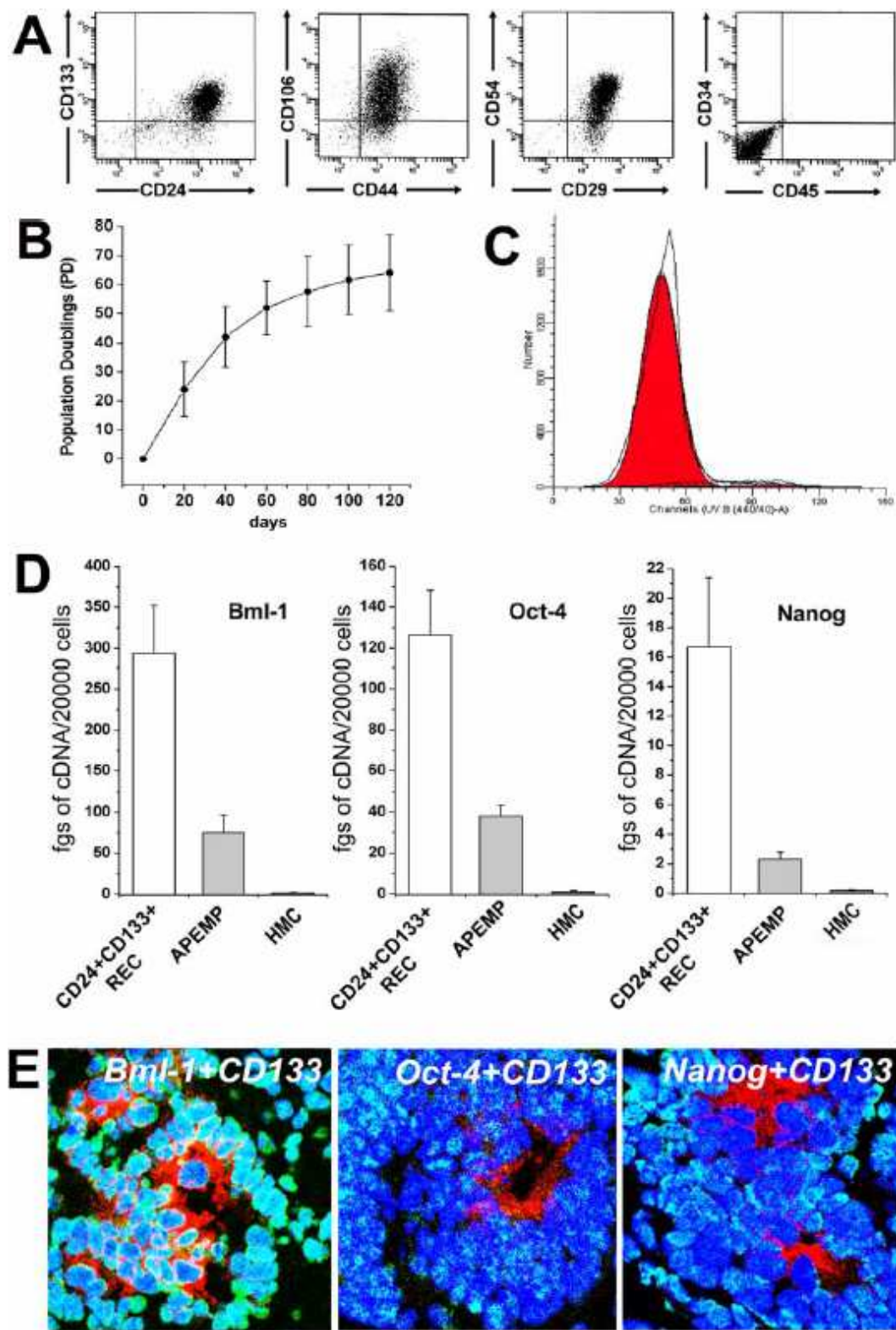


Figura 3. Isolamento e caratterizzazione delle CD24+CD133+REC e confronto con le CD24+CD133+APEMP.

(A) Analisi citofluorimetrica delle CD24+CD133+REC purificate con tecnica immunomagnetica a partire da una sospensione di cellule embrionali renali. In figura è mostrata una immagine rappresentativa di 4 esperimenti.

(B) Le CD24+CD133+REC sono state espanse in coltura per 60-80 PD durante un periodo di 4 mesi. I risultati sono espressi come medie \pm errore standard della media, analizzando 4 diversi donatori.

(C) L'analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA eseguita su colture di CD24+CD133+REC espanse per 80 PD dimostra un contenuto 100% euploide di DNA. È mostrato un esperimento rappresentativo di 4 esperimenti separati.

(D) Valutazione dei livelli di mRNA per i fattori trascrizionali Bmi-1, Oct-4 e Nanog mediante real-time quantitative RT-PCR in colture di CD24+CD133+REC (□), APEMP (■) e HMC (■). I dati, espressi come medie \pm errore standard della media, sono il risultato di esperimenti effettuati in triplicato su colture primarie provenienti da 5 diversi donatori.

(E) Doppia immunofluorescenza per Bmi-1 (verde), Oct-4 (verde), Nanog (verde) e CD133 (rosso).

Il To-pro-3 evidenzia tutti i nuclei in blu. Ingrandimento: x40 (zoom 1.7, 2 e 2.6, rispettivamente).

Per valutare il loro potenziale multidifferenziativo, le CD24+CD133+REC sono state clonate mediante diluizione limite (Figura 4A). Dei cloni ottenuti, a partire da donatori di diverse epoche gestazionali, 29 a caso (9 settimane, n=7; 11 settimane, n=6; 12 settimane, n=9; 14 settimane, n=7), sono stati analizzati, e tutti esprimevano il fenotipo CD24+CD133+ (Figura 4B). Le CD24+CD133+REC ottenute dallo stesso singolo clone sono state coltivate in condizioni favorenti il differenziamento tubulogenico, osteogenico, adipogenico, stromale o endoteliale. L'analisi dell'espressione genica mediante Real time RT-PCR ha dimostrato che il differenziamento di singoli cloni a cellule tubulari determinava un marcato incremento dell'espressione di mRNA caratteristici per differenti porzioni del nefrone, quali: l'aminopeptidasi A, il cotrasportatore Na/Gluc1, la gamma-glutamyl transferasi (γ -GT), lo scambiatore Na/H, l'acquaporina 1 (AQP1), l'acquaporina 3 (AQP3), il trasportatore Na/Cl sensibile ai diuretici tiazidici, la calbindina D-28k o il Canale β del Na (ENaC- β) (Tabella 1). Inoltre, il *marker* del tubulo prossimale Megalina, il *marker* del tubulo distale Glicoproteina di Tamm-Horsfall (THG), come anche il *marker* del dotto collettore ENaC- β erano ugualmente rilevabili come proteine (Figura 4C). Dopo induzione del differenziamento osteogenico, i cloni delle CD24+CD133+REC mostravano un evidente incremento dell'espressione di mRNA per il Runx2, l'Osteopontina e la Fosfatasi Alcalina (AP) (Tabella 1). Inoltre, le cellule formavano colonie fosfatasi alcalina-positive che davano luogo a noduli mineralizzati evidenziabili con la marcatura con Alizarin Red (Figura 4D). Il differenziamento adipogenico è stato dimostrato dal netto incremento dei livelli di mRNA dei fattori Adiponectina e PPAR- γ (Tabella 1), nonché dalla presenza di vacuoli lipidici intracitoplasmatici

evidenziabili con marcatura con Oil Red O, che erano assenti nelle cellule indifferenziate (Figura 4E). Se coltivate in condizioni favorevoli al differenziamento endoteliale, le CD24+CD133+REC mostravano un marcato incremento dell'espressione di mRNA per KDR, Tie-2, VE-cadherin e fattore di von Willebrand (vWf, Tabella 1) ed, inoltre, risultavano positive alla marcatura in immunofluorescenza per il vWf (dati non mostrati). Per valutare il differenziamento endoteliale *in vivo*, le CD24+CD133+REC coltivate per 21 giorni in *medium* per il differenziamento endoteliale sono state raccolte, marcate con colorante sopravvital PKH26 ed inoculate sottocute in topi SCID in una matrice di Matrigel priva di fattori di crescita. Dopo 15 giorni, l'analisi delle masserelle di Matrigel ha evidenziato che le cellule umane marcate con il PKH26 si erano organizzate *in vivo* a formare strutture vascolari positive alla marcatura per il vWf (Figura 4F). Infine, dopo 15 giorni di coltura in *medium* per il differenziamento stromale, le CD24+CD133+REC mostravano una iper-espressione di mRNA codificanti per l'actina- α del muscolo liscio (*α -smooth muscle actin* o α -SMA), l'elastina e la calponina (Tabella 1), nonché la positività all'immunofluorescenza per α -SMA, calponina e proteina α della catena pesante della miosina muscolare (*α -smooth muscle myosin heavy chain protein* o SM-MHC) (Figura 4G), suggerendo la capacità di differenziare in miofibroblasti e cellule muscolari lisce.

Figura 4

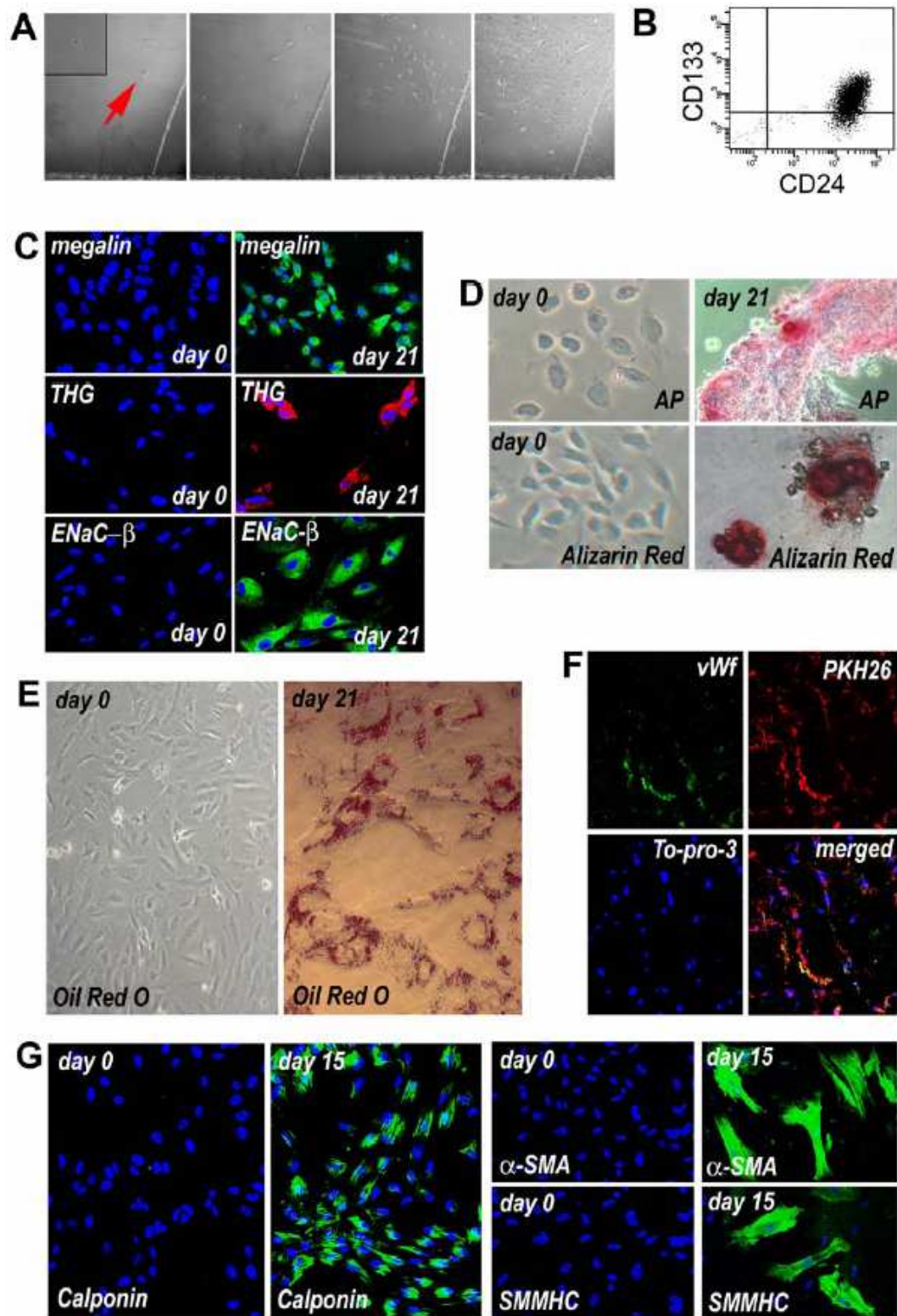


Figura 4. Le CD24+CD133+REC mostrano potenzialità multidifferenziativa.

(A) Immagine rappresentativa della deposizione di una singola cellula (freccia rossa, in alto a sinistra), ottenuta dopo diluizione limite di CD24+CD133+REC, seguita dalla sua proliferazione e formazione di un clone (pannelli seguenti).

(B) La totalità delle cellule derivate dal clone mostrato in A co-esprime i marcatori CD24 e CD133 (Analisi citofluorimetrica).

(C) Immagini rappresentative della marcatura per Megalina (verde), Glicoproteina di Tamm-Horsfall (THG) (rosso) ed EnaC- β (verde) prima (giorno 0) e dopo (giorno 21) coltura delle CD24+CD133+REC in *medium* differenziativo tubulogenico (Microscopia confocale). I nuclei sono stati evidenziati con il To-pro-3 (blu).

(D) Immagini rappresentative della marcatura istochimica per Fosfatasi Alcalina (AP) ed Alizarin Red prima (giorno 0) e dopo (giorno 21) coltura delle CD24+CD133+REC in *medium* differenziativo osteogenico.

(E) Immagini rappresentative della marcatura istochimica per Oil Red O prima (giorno 0) e dopo (giorno 21) coltura delle CD24+CD133+REC in *medium* differenziativo adipogenico.

(F) Le CD24+CD133+REC, marcate con PKH26 (rosso) e differenziate in cellule endoteliali, se inoculate sotto cute in topi SCID si organizzano spontaneamente a formare strutture vascolari che esprimono il vWf (verde).

(G) Immagini rappresentative della marcatura per Calponina (verde), α -SMA (verde), e proteina α della catena pesante della miosina muscolare (*α -smooth muscle myosin heavy chain protein* o SM-MHC) (verde) prima (giorno 0) e dopo (giorno 21) coltura delle CD24+CD133+REC in *medium* differenziativo stromale (Microscopia confocale). I nuclei sono stati evidenziati con il To-pro-3 (blu).

Ingrandimento: x20 in C e G (zoom 0.7 a sinistra; zoom 1.1 a destra); x10 in D; x5 in E; x40 in F.

Tabella 1. Livelli di mRNA di diversi *markers* dopo differenziamento delle CD24+CD133+REC a cellule tubulari, osteoblasti, adipociti, cellule endoteliali e stromali ^(a).

Parametro	Incremento dei livelli di mRNA rispetto al basale ^(b)
<i>Differenziamento Tubulare</i>	
Cotrasportatore Na/Gluc1	*7.44±2.84
Aminopeptidasi A	*55.8±24.8
Aquaporina-1	*33.4±11.9
Aquaporina-3	*6.8±1.2
γ-glutamilttransferasi (γ-GT)	*26.1±14.5
Trasportatore Na/Cl	*52.1±22.2
Calbindina D 28k	*5.1±1.1
Canale β del Na (ENaC-β)	*4.15±0.55
Scambiatore Na/H	*4.2±1.5
<i>Differenziamento Osteogenico</i>	
Runx 2	*8.7±4.2
Osteopontina	*23.17±14
Fosfatasi Alcalina (AP)	*53.4±19
<i>Differenziamento Adipogenico</i>	
Adiponectina	*13.5±7.6
PPARγ	*9.3±3
<i>Differenziamento Endoteliale</i>	
KDR	*10.1±2.8
Tie 2	*10±4.8
VE cadherina	*4.8±1.1
Fattore di Von Willebrand (vWf)	*7.6±2.7
<i>Differenziamento Stromale</i>	
α-SMA	*19.6±5.0
Calponina	*21.4±8.7
Elastina	*11.3±3.5

^(a) Valutazione mediante Quantitative RT-PCR dell'incremento dei livelli di mRNA per *markers* specifici di diversi tipi cellulari dopo coltura di singoli cloni in *medium* di differenziamento specifici confrontati con i valori ottenuti dagli stessi cloni prima del differenziamento a cellule tubulari, osteoblasti, adipociti, cellule endoteliali e stromali. I dati sono espressi come medie ± errore standard della media di triplicati analizzati in dieci differenti cloni.

^(b) $p < 0.05$

È opportuno sottolineare che quando una sospensione di singole cellule ottenute da undici cloni sono state riclonate mediante diluizione limite, i subcloni risultanti mostravano la stessa capacità di multidifferenziamento del clone di origine, fornendo un'ulteriore evidenza che le CD24+CD133+REC sono multipotenti e mostrano capacità di autorinnovamento in coltura. Inoltre, i cloni ottenuti da donatori di 9, 11, 12 o 14 settimane di età gestazionale mostravano una capacità paragonabile di autorinnovamento e multidifferenziamento, suggerendo che queste proprietà siano condivise dalle CD24+CD133+REC indipendentemente dall'età gestazionale (dati non mostrati).

Inoltre, il differenziamento delle CD24+CD133+REC si associava ad una significativa riduzione dell'espressione dei *markers* di staminalità Oct-4, BmI-1, Nanog, CD133 e CD24 (Figura 5), che si osservava a partire dal momento in cui le cellule iniziavano ad acquisire i *markers* di differenziamento. Un comportamento simile è stato osservato in tutti i cloni analizzati. Un parallelismo significativo tra i markers di differenziamento ed i markers di staminalità BmI-1, Oct-4, Nanog, CD24 e CD133 è mostrato in Figura 6, A-C.

Figura 5

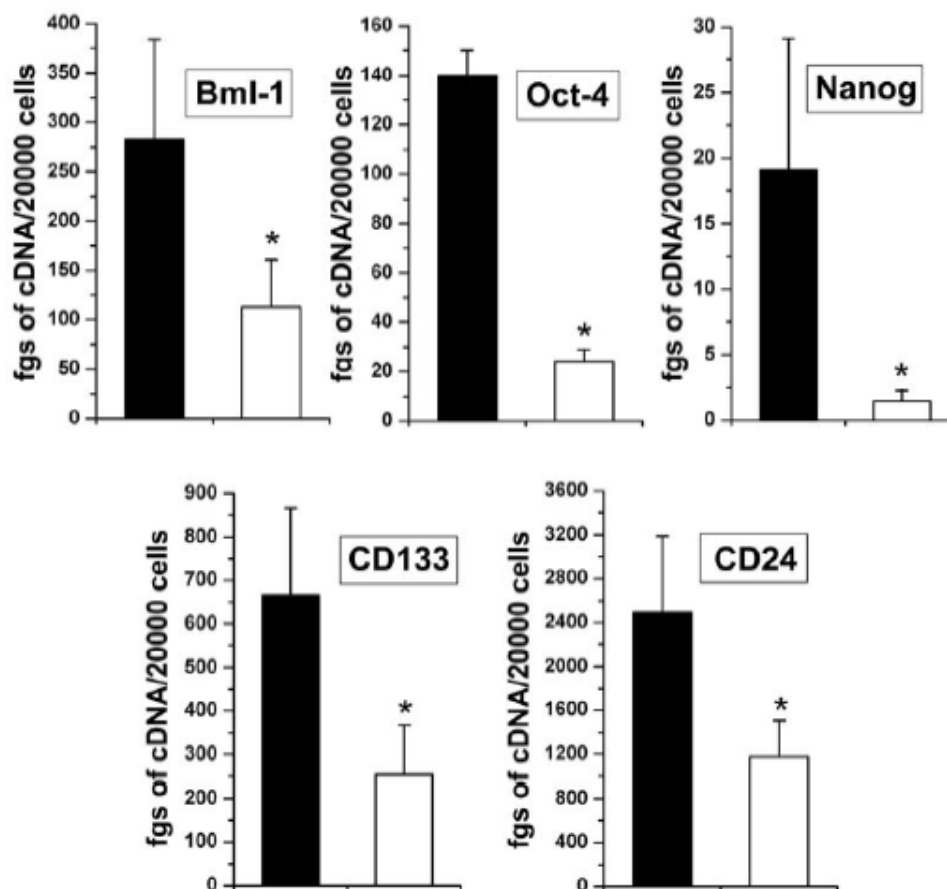


Figura 5. Valutazione dei livelli dei markers di staminalità.

I livelli di mRNA codificanti per Bmi-1, Oct-4, Nanog, CD133 e CD24 valutati in cloni in coltura di CD24+CD133+REC, inizialmente elevati (colonne nere) si riducono sensibilmente dopo induzione di differenziamento (colonne bianche) (Real-Time Quantitative PCR). I dati sono espressi come media \pm errore standard della media di triplicati analizzati in dieci differenti cloni.

Figura 6

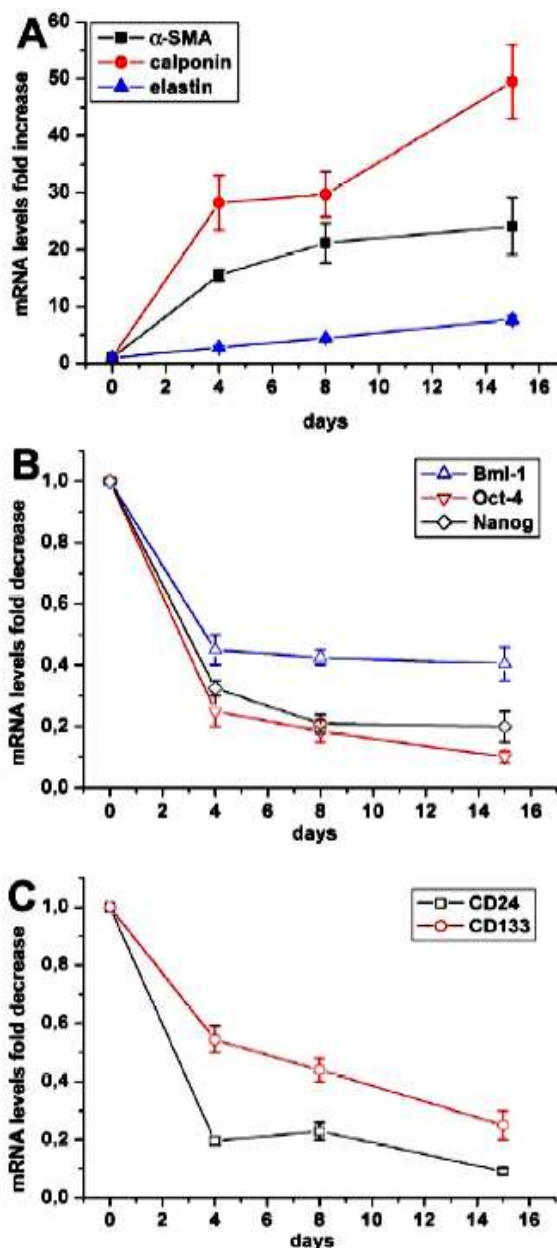


Figura 6. Variazione nel tempo dei livelli dei *markers* stromali e dei *markers* staminali dopo l'induzione del differenziamento.

Variazioni temporali dei livelli dei *markers* di differenziamento α -SMA, Calponina ed Elastina (A), come anche dei *markers* staminali Bmi-1, Oct-4, Nanog (B), CD133 e CD24 (C) a seguito dell'induzione del differenziamento stromale (Real-Time Quantitative PCR). I dosaggi sono stati effettuati in un clone rappresentativo delle CD24+CD133+REC a differenti tempi a seguito del differenziamento stromale. I dati sono espressi come media \pm errore standard della media di triplicati analizzati, intesi come incremento dei livelli di mRNA rispetto al basale (tempo 0).

Le CD24+CD133+REC differenziano in diversi tipi di cellule residenti renali in topi SCID affetti da Insufficienza Renale Acuta

Per valutare la capacità delle CD24+CD133+REC di contribuire alla rigenerazione renale, è stato utilizzato un modello *in vivo* di insufficienza renale acuta rhabdmiolisi-indotta, in seguito ad inoculo intramuscolo di glicerolo⁵. Le CD24+CD133+REC marcate con PKH26 sono state inoculate, nella vena della coda di topi SCID trattati con il glicerolo, al momento del picco di azotemia (*Blood Urea Nitrogen* o BUN) (giorni 3 e 4).

Come controlli, due gruppi di topi SCID affetti da NTA indotta da glicerolo sono stati trattati rispettivamente con soluzione fisiologica o con un equivalente numero di HMC marcate con PKH26. Dieci giorni dopo, i topi sono stati sacrificati, ed i reni raccolti ed analizzati. Mentre non sono mai state rilevate cellule marcate negli animali inoculati con soluzione fisiologica (dati non mostrati) o con HMC (Figura 7A), nei topi inoculati con le CD24+CD133+REC, si osservava una diffusione delle cellule a livello sia della corticale che della midollare (segnale rosso, Figura 7, B e C). Nel rene, le CD24+CD133+REC marcate con PKH26 risultavano incorporate a livello tubulare, dove esprimevano *markers* specifici di differenti porzioni del nefrone, quali il marker del tubulo prossimale LTA ($15.68 \pm 8.12\%$ di tutte le cellule marcate con LTA) o il marker del tubulo distale e del dotto collettore DBA ($14.48 \pm 3.93\%$ di tutte le cellule marcate con DBA), che marca i tubuli convoluti distali, i tubuli di connessione ed i dotti collettori (Figura 7, B-F). Inoltre, è stata esaminata la capacità proliferativa *in vivo* delle CD24+CD133+REC. A questo fine, è stata utilizzata la BromodesossiUridina (BrdU) inoculata a livello intraperitoneale, ogni giorno, in 10 topi affetti da IRA

indotta dal glicerolo e trattati con CD24+CD133+REC marcate con PKH26. Le cellule proliferanti BrdU-positive erano abbondantemente rilevate nel rene a 4-6 giorni dopo l'induzione del danno. A dimostrazione del fatto che le CD24+CD133+REC proliferano *in vivo*, sono state osservate cellule tubulari marcate con PKH26 che esprimevano BrdU a livello nucleare (Figura 8).

A seguito di ulteriori analisi, sono state evidenziate anche rare cellule positive al PKH26 e contemporaneamente al marker CD31, suggerendo che, pur se in piccola percentuale ($2.2 \pm 0.6\%$), le CD24+CD133+REC potrebbero anche acquisire il fenotipo di cellule endoteliali (Figura 7G).

Inoltre, nei reni di topi SCID inoculati con le HMC (Figura 7H), l'espressione dell'antigene HLA-I umano non è mai stato rilevato, mentre lo stesso antigene era presente in misura consistente nei campioni renali provenienti dagli animali inoculati con le CD24+CD133+REC (Figura 7I). La doppia immunoistochimica per l'antigene HLA-I umano e la citocheratina confermava l'impianto delle CD24+CD133+REC nelle strutture tubulari (Figura 7I).

Figura 7

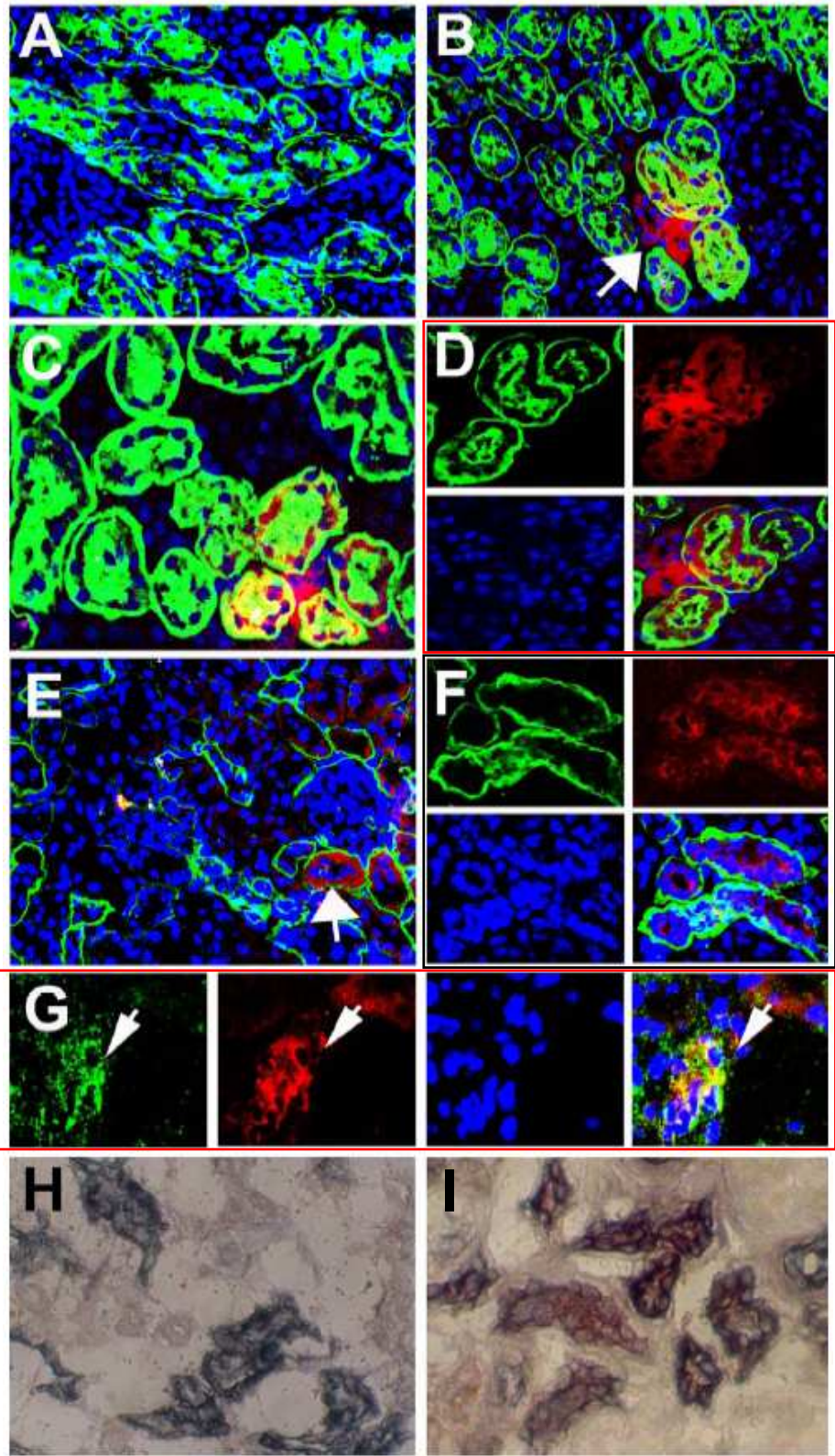


Figura 7. Impianto delle CD24+CD133+REC in topi SCID affetti da IRA e formazione di differenti tipi di cellule tubulari.

(A) In un'immagine rappresentativa di sezioni di rene di topo affetto da IRA ed inoculato con HMC pre-trattate con PKH26 (rosse), dopo marcatura con LTA (verde), non si evidenzia la presenza di cellule marcate di rosso.

(B) In un'immagine rappresentativa di sezioni di rene di topo affetto da IRA ed inoculato con cellule embrionali renali CD24+CD133+ pre-trattate con PKH26 (rosse), dopo marcatura con LTA (verde), si evidenzia la presenza di cellule marcate di rosso all'interno dei tubuli (freccia).

(C) Maggior ingrandimento di un'altra sezione di rene di topo affetto da IRA ed inoculato con cellule embrionali renali CD24+CD133+ pre-trattate con PKH26 (rosse), dopo marcatura con LTA (verde).

(D) Maggior ingrandimento della sezione di rene mostrata in B, che dimostra la rigenerazione di un tubulo prossimale.

(E) In un'immagine rappresentativa di sezioni di rene di topo affetto da IRA ed inoculato con cellule embrionali renali CD24+CD133+ pre-trattate con PKH26 (rosse), dopo marcatura con *Dolichos Biflorus Agglutinin* (DBA, verde), si dimostra la rigenerazione dei tubuli distali e dei dotti collettori (freccia). Nella stessa area sono visibili altre strutture tubulari marcate con PKH26 ma negative al DBA.

(F) Maggior ingrandimento di tubuli renali che co-esprimono PKH26 (rosso) e DBA (verde).

(G) Immagine rappresentativa di una sezione di rene ottenuto da un topo affetto da IRA e trattato con cellule embrionali renali CD24+CD133+ marcate con PKH26 (rosso) che co-esprimono il *marker* endoteliale CD31 (verde).

(H) Immunoistochimica doppia per citocheratina (blu) ed antigene HLA-I umano (rosso) in reni di topi SCID affetti da IRA. Assenza di segnale rosso nei tubuli renali di un topo trattato con le HMC.

(I) Cellule positive all'antigene HLA-I umano (rosso) in tubuli renali che co-esprimono la citocheratina (blu) sono rinvenute in topi SCID affetti da IRA dopo l'inoculo di cellule embrionali renali CD24+CD133+.

Ingrandimento: x20 in A, B, C (zoom 1.7), D (zoom 2.5), E e F (zoom 3.8); x40 in G (zoom 2.7), H ed I.

Figura 8



Figura 8. Proliferazione in vivo delle CD24+CD133+REC.

Co-localizzazione di PKH26 (rosso) e BrdU (verde) nel rene di un topo affetto da IRA, inoculato quotidianamente con BrdU e trattato con CD24+CD133+REC (Microscopia confocale). Le frecce indicano le CD24+CD133+REC proliferanti e marcate con PKH26. Ingrandimento: x40 (zoom 2.1).

Le CD24+CD133+REC inducono un completo recupero della funzione e della morfologia renale

Sono stati misurati i livelli di BUN nei topi affetti da IRA indotta dal glicerolo e trattati con le CD24+CD133+REC, con la soluzione fisiologica o con le HMC. Nei topi trattati con la soluzione fisiologica o con le HMC, l'inoculo del glicerolo induceva un significativo incremento dei livelli sierici di BUN, che mostravano un picco al giorno 3, declinavano al giorno 7 e si stabilizzavano al giorno 14 e 16 a valori significativamente più alti rispetto ai topi sani (Figura 9, A-B)^{5,105}. Al contrario negli animali trattati con inoculo endovena di CD24+CD133+REC si osservavano livelli di BUN significativamente più bassi ai giorni 11, 14 e 16 rispetto ai topi trattati con soluzione fisiologica o HMC (Figura 9, A-B). Un'analisi statistica dei livelli di BUN al giorno 14 tra i diversi gruppi di topi dimostrava che i topi trattati con le CD24+CD133+REC esibivano livelli di BUN significativamente inferiori rispetto ai topi trattati con la soluzione fisiologica o con le HMC e paragonabili ai topi sani (Figura 9B). Risulta interessante osservare come simili risultati si ottenevano in due gruppi di topi trattati con CD24+CD133+REC derivate rispettivamente da donatori di 9 o di 13 settimane di gestazione (Figura 9B). Al contrario, i topi trattati con la soluzione fisiologica mostravano livelli di BUN significativamente più elevati rispetto ai topi trattati con le CD24+CD133+REC o ai topi sani, ma paragonabili a quelli dei topi trattati con le HMC (Figura 9B). Conseguentemente i topi trattati con le HMC mostravano livelli di BUN significativamente più elevati rispetto ai topi trattati con le CD24+CD133+REC o ai topi sani, ma paragonabili a quelli dei topi trattati con la soluzione fisiologica (Figura 9B).

Figura 9

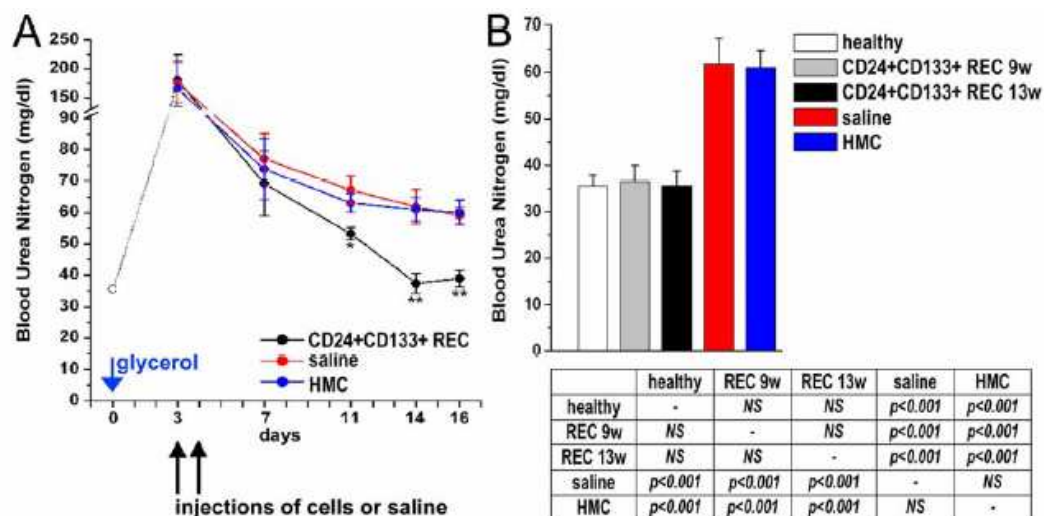


Figura 9. Le CD24+CD133+REC proteggono i topi trattati col glicerolo dal deterioramento della funzione renale.

(A) I livelli di BUN misurati in topi non trattati (cerchio bianco), o inoculati con glicerolo e trattati con soluzione fisiologica (cerchio rosso), con HMC (cerchio blu) o con CD24+CD133+REC (cerchio nero). La freccia blu indica il giorno dell'inoculo del glicerolo, mentre le frecce nere indicano i giorni della somministrazione della soluzione fisiologica, delle HMC o delle CD24+CD133+REC. I dati sono espressi come media \pm errore standard della media. $*P < 0.05$ e $**P < 0.001$ *versus* glicerolo e soluzione fisiologica o glicerolo e HMC, valutata allo stesso giorno ($n = 8$ topi ad ogni punto di misura per ogni gruppo di trattamento; $n = 16$ al giorno 0).

(B) Confronto dei livelli di BUN al giorno 14 tra topi sani (bianco), topi trattati con CD24+CD133+REC isolate da donatori di 9 settimane (grigio chiaro), o di 13 settimane (nero), topi trattati con soluzione fisiologica (rosso) e con HMC (blu) ($n = 8$ topi ad ogni punto di misura per ogni gruppo di trattamento; $n = 16$ al giorno 0).

I dati sono espressi come media \pm errore standard della media.

Successivamente abbiamo valutato se il trattamento con le CD24+CD133+REC potesse preservare anche la morfologia renale. Nella Figura 10 sono mostrate delle immagini rappresentative della morfologia renale, valutata con il PAS o con la Tricromica di Masson, di topi sani (giorno 0) e di topi valutati dopo 14 giorni dall'induzione di IRA a seguito del trattamento con le CD24+CD133+REC o con le HMC. I topi sani mostravano una morfologia renale normale (Figura 10, A e B, sinistra), mentre le sezioni di tessuto renale ottenute al giorno 14 da topi affetti da IRA e trattati con le HMC (Figura 10, A e B, centro) o soluzione fisiologica (dati non mostrati) mostravano estese aree focali di fibrosi interstiziale. Al contrario, nei topi trattati con le CD24+CD133+REC, generalmente, si osservava una morfologia renale normale (Figura 10, A e B, destra). Le sezioni sono state esaminate per la presenza di tubuli atrofici, identificati dall'ispessimento della membrana basale tubulare, o per la presenza di cicatrici intra-renali. La quantificazione delle aree di atrofia tubulare e di fibrosi tubulointerstiziale è mostrata in Figura 10E. Le aree fibrose sono state anche quantificate attraverso la misurazione della fluorescenza verde per l'espressione di α -SMA e TGF β -1 mediante analisi d'immagine. Nella Figura 10, C e D, sono mostrate delle immagini acquisite al microscopio confocale e rappresentative di sezioni di parenchima renale di topi sani, topi trattati con le HMC o topi trattati con le CD24+CD133+REC (Figura 10, C e D). La quantizzazione delle aree di tessuto marcate con α -SMA e TGF β -1 è mostrata nella Figura 10F.

Figura 10

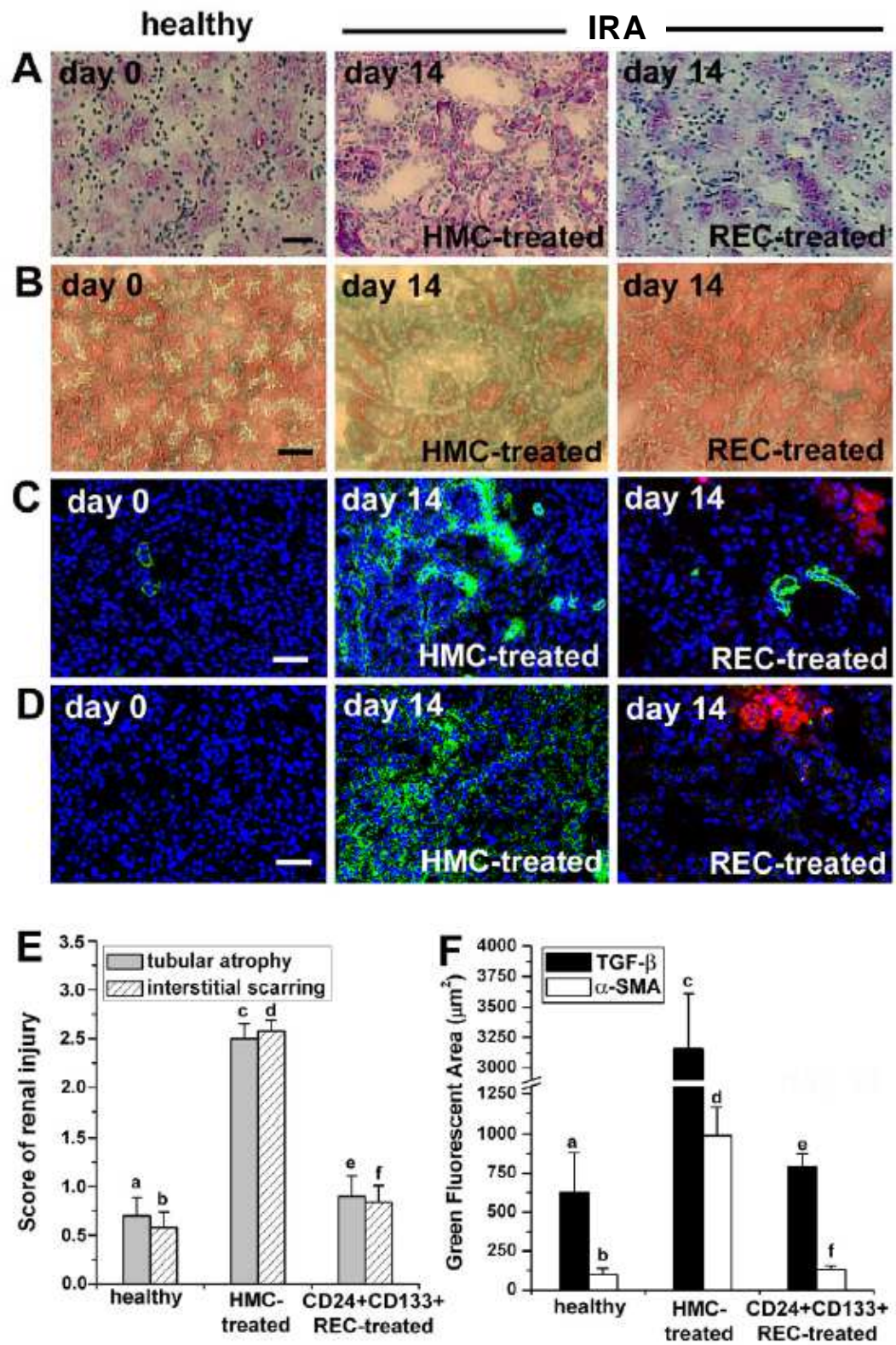


Figura 10. Le CD24+CD133+REC preservano la morfologia renale in topi trattati con il glicerolo.

(A) Immagine rappresentativa di reni ottenuti da topi sani (sinistra) e da topi affetti da IRA trattati con HMC (centro) o con CD24+CD133+REC (destra) e marcati con PAS al giorno 14 (Obiettivo x20).

(B) Immagine rappresentativa di reni ottenuti da topi sani (sinistra) e da topi affetti da IRA trattati con HMC (centro) o con CD24+CD133+REC (destra) e marcati con Tricromica di Masson al giorno 14 (Obiettivo x20).

(C, sinistra) Immagine rappresentativa di reni ottenuti da topi sani e marcati con α -SMA (verde). I nuclei sono marcati con To-pro-3. (Centro) Immagine rappresentativa di reni ottenuti da topi affetti da IRA e trattati con HMC e marcati con α -SMA (verde) al giorno 14. I nuclei sono marcati con To-pro-3. (Destra) Immagine rappresentativa di reni ottenuti da topi affetti da IRA e trattati con CD24+CD133+REC (rosse) e marcati con α -SMA (verde) al giorno 14. I nuclei sono marcati con To-pro-3.

(D, sinistra) Immagine rappresentativa di reni ottenuti da topi sani e marcati con TGF- β 1 (verde). I nuclei sono marcati con To-pro-3. (Centro) Immagine rappresentativa di reni ottenuti da topi affetti da IRA e trattati con HMC e marcati con TGF- β 1 (verde) al giorno 14. I nuclei sono marcati con To-pro-3. (Destra) Immagine rappresentativa di reni ottenuti da topi affetti da IRA e trattati con CD24+CD133+REC (rosse) e marcati con TGF- β 1 (verde) al giorno 14. I nuclei sono marcati con To-pro-3.

(E) Comparazione quantitativa delle aree di fibrosi tra reni ottenuti da topi trattati con soluzione fisiologica o CD24+CD133+REC dopo 14 giorni dall'inoculo del glicerolo. Le sezioni sono state analizzate per la presenza di atrofia tubulare (grigio) e cicatrice interstiziale (linee nere oblique). c *versus* a, $P < 0.001$; d *versus* b, $P < 0.001$; e *versus* c, $P < 0.001$; f *versus* d, $P < 0.001$; e *versus* a, NS; f *versus* b, NS.

(F) La comparazione quantitativa delle aree di fibrosi tra reni ottenuti da topi trattati con soluzione fisiologica o CD24+CD133+REC dopo 14 giorni dall'inoculo del glicerolo è stata eseguita mediante analisi d'immagine dopo marcatura delle sezioni con α -SMA e TGF- β 1. c *versus* a, $P < 0.001$; d *versus* b, $P < 0.001$; e *versus* c, $P < 0.001$; f *versus* d, $P < 0.001$; e *versus* a, NS; f *versus* b, NS. Ingrandimento, x20.

Le CD24+CD133+REC prevengono l'insorgenza di IRA severa attraverso un incremento dei processi riparativi

Nonostante che il picco dei livelli di BUN sia osservato dopo 3 giorni, la proliferazione delle cellule tubulari renali endogene prevalentemente occorre nelle prime 48 ore e potrebbe portare a una sottostima del potenziale beneficio del trattamento con CD24+CD133+REC. Quindi, per valutare se le CD24+CD133+REC potessero anche prevenire l'IRA, altri gruppi di topi sono stati inoculati con CD24+CD133+REC o con soluzione fisiologica 4 e 24 ore dopo l'inoculo di glicerolo. Le misurazioni dei livelli di BUN a 4 e 6 giorni ha dimostrato che i topi trattati con CD24+CD133+REC mostravano una ridotta entità del danno in corso di IRA se confrontati con gli animali trattati con la soluzione fisiologica (Figura 11A). Anche in questa seconda serie di esperimenti, il completo recupero della funzione renale (giorno 14) è stato osservato soltanto nei topi trattati con le CD24+CD133+REC (Figura 11A). La valutazione al giorno 4 della morfologia renale dei reni dei topi trattati con la soluzione fisiologica dopo la colorazione con ematossilina ed eosina (Figura 11B), PAS (dati non mostrati), e con il *marker* del citoscheletro Phalloidina (Figura 11D) ha evidenziato ampie aree di necrosi con cilindri ialini intraluminari, modificazioni degenerative delle cellule tubulari e perdita dell'epitelio. Al contrario, nei topi trattati con le CD24+CD133+REC, si evidenziavano solo piccole aree di danno tissutale (Figura 11C e E).

É interessante notare, inoltre, come le sezioni renali di topi trattati con le CD24+CD133+REC pre-marcate con PKH26 mostrassero, al giorno 4, estese aree di rigenerazione tissutale, operata proprio dalle cellule CD24+CD133+REC,

evidenziabili grazie al colorante PKH26 (Figura 11E), che coesprimevano anche *markers* tubulari (Figura 11F), mentre, cellule CD24+CD133+REC positive al PKH26 non venivano mai rinvenute in associazione alle aree di necrosi, in verità rare. Un'analisi comparativa delle aree di necrosi e del danno tissutale tra reni ottenuti da topi trattati con la soluzione fisiologica piuttosto che con le CD24+CD133+REC è mostrata in Figura 11G.

Le CD24+CD133+REC non hanno la capacità di formare tumori in vivo

Nel nostro studio è stata valutata anche la possibilità che l'inoculo delle CD24+CD133+REC potesse indurre la formazione di teratomi *in vivo*. Per valutare la loro potenziale tumorigenicità, 1.5×10^6 cellule sono state inoculate sottocute in dieci topi NOD/SCID di 8 settimane. All'esame necroscopico condotto tre mesi dopo l'inoculo delle CD24+CD133+REC, nessuno dei dieci topi aveva sviluppato alcun tipo di tumore.

Figura 11

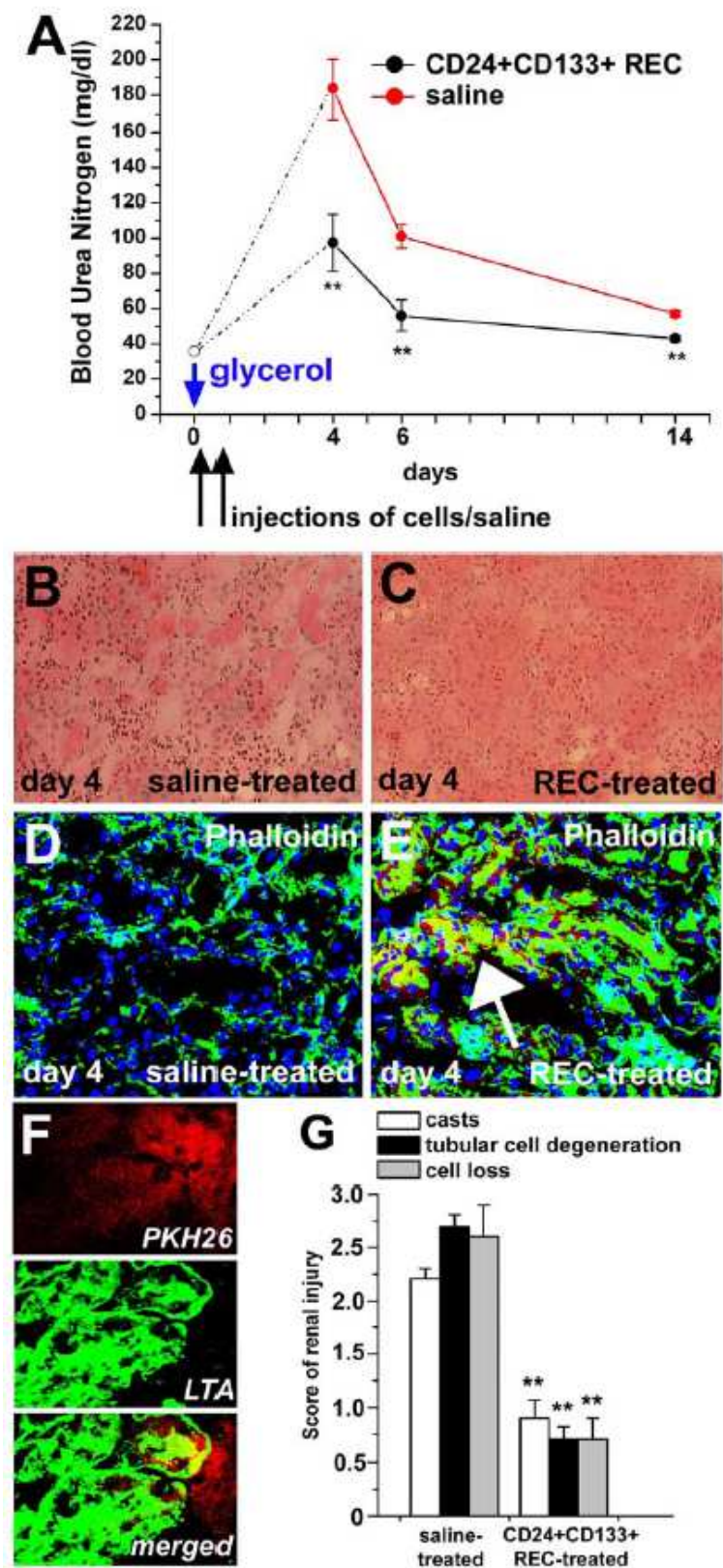


Figura 11. Le CD24+CD133+REC prevengono l'insorgenza di Insufficienza Renale Acuta.

(A) Livelli di BUN misurati in topi non trattati (cerchio bianco), o inoculati con glicerolo e trattati con soluzione fisiologica (cerchio rosso) o con CD24+CD133+REC (cerchio nero). La freccia blu indica il giorno dell'inoculo del glicerolo, mentre le frecce nere indicano il momento della somministrazione della soluzione fisiologica o delle CD24+CD133+REC. I dati sono espressi come media \pm errore standard della media. $**p < 0.001$ *versus* glicerolo e soluzione fisiologica valutata allo stesso giorno ($n = 8$ topi a ogni punto di misura per ogni gruppo di trattamento; $n = 16$ al giorno 0).

(B) Immagine rappresentativa di rene di topo affetto da IRA trattato con soluzione fisiologica e marcato con ematossilina ed eosina al giorno 4.

(C) Immagine rappresentativa di rene di topo affetto da IRA trattato con CD24+CD133+REC e marcato con ematossilina ed eosina al giorno 4.

(D) Immagine rappresentativa di rene di topo trattato con soluzione fisiologica e marcato con Phalloidina (verde) al giorno 4 dall'iniezione di glicerolo.

(E) Immagine rappresentativa di rene di topo trattato con CD24+CD133+REC (rosso) e marcato con Phalloidina (verde) al giorno 4, dall'iniezione di glicerolo, che dimostra la rigenerazione di strutture tubulari da parte delle CD24+CD133+REC (freccia).

(F) Immagine rappresentativa di rene di topo trattato con CD24+CD133+REC (rosso) e marcato con LTA (verde) al giorno 4 dall'iniezione di glicerolo.

(G) Comparazione quantitativa delle aree di danno tissutale tra reni ottenuti da topi trattati con soluzione fisiologica o CD24+CD133+REC dopo 4 giorni dall'inoculo del glicerolo. Le sezioni sono state analizzate per la presenza di cilindri (bianco), degenerazione delle cellule tubulari (nero) e denudamento dell'epitelio tubulare (grigio).

$**P < 0.001$. Ingrandimento: x20 in A, B, C, D (zoom 1.5), E (zoom 1.5), F (zoom 2.2).

DISCUSSIONE

La scoperta dei meccanismi rigenerativi di un organo deve necessariamente derivare dalla comprensione dei normali processi di sviluppo. Infatti, è normalmente accettato che le cellule staminali/progenitrici rappresentino una popolazione residua direttamente derivata dal progenitore embrionale organo-specifico, che è coinvolto nell'organogenesi durante il periodo fetale^{3,106,107}. Noi abbiamo recentemente identificato nel rene adulto umano le cellule denominate APEMP, una popolazione di cellule progenitrici multipotenti caratterizzate dalla co-espressione di due *markers* di staminalità, CD133 e CD24⁵. Questo, ci ha consentito di valutare se la co-espressione dei fattori CD133 e CD24, potesse essere utile anche per individuare cellule staminali/progenitrici multipotenti renali presenti durante il periodo embrionale. Sorprendentemente, abbiamo osservato che, nelle prime fasi della nefrogenesi, la co-espressione di CD133 e CD24 caratterizzava le vescicole renali e i corpuscoli a forma di S, ma durante lo sviluppo glomerulare la loro espressione rimaneva confinata ad una sottopopolazione di cellule della capsula di Bowman. In accordo con la loro natura putativa di cellule staminali/progenitrici, le CD24+CD133+REC esprimevano alti livelli di fattori di trascrizione specifici delle SC, ovvero Oct-4¹⁰⁸ Nanog¹⁰⁸ e Bmi-1¹⁰⁹, e mostravano capacità di autorinnovamento come anche di multipotenza *in vitro*, come valutato su progenie di cloni derivati da singole

cellule. Le CD24+CD133+REC sono in grado di dare origine a cellule tubulari di differenti porzioni del nefrone, come anche a diversi tipi cellulari extrarenali (adipociti ed osteoblasti), indicando così la loro natura di progenitori multipotenti; sono inoltre in grado di differenziare in cellule endoteliali e stromali, in accordo con precedenti osservazioni che suggeriscono come, le cellule del mesenchima metanefrico possano anche dare origine alla componente endoteliale e stromale del rene¹¹⁰⁻¹¹². È interessante osservare che, a seguito del differenziamento tubulare, le CD24+CD133+REC possono acquisire alcuni *markers* del tubulo di connessione tra il tubulo distale ed il dotto collettore, confermando quanto già descritto in merito alla capacità delle cellule del mesenchima metanefrico di generare anche cellule del tubulo di connessione, che mostrano caratteristiche fenotipiche delle cellule del dotto collettore¹¹³. L'esistenza di una cellula putativa del mesenchima metanefrico con potenzialità staminali era già stata descritta²², ma la natura ed i *markers* di superficie di questa popolazione non erano ancora stati individuati^{3,110,111}. Evidenze concordi suggeriscono che questa cellula putativa potrebbe essere particolarmente arricchita in reni di età pari a 8 settimane di gestazione¹¹⁴. Infatti, i tessuti renali fetali ottenuti tra 10 e 14 settimane di gestazione mantengono la proprietà di generare *de novo* nefroni funzionanti, ma generano un più piccolo numero di glomeruli e tubuli maturi rispetto ai reni di 8 settimane di gestazione¹¹⁴. In accordo con questi dati, i risultati del nostro studio suggeriscono che le CD24+CD133+REC siano più rappresentate nei reni di 8-9 settimane di gestazione, mentre si riducono marcatamente durante la 10^a-14^a settimana, fino a rappresentare meno del 2% di tutte le cellule renali nell'individuo adulto. È interessante notare che sia nei reni fetali che nei reni

adulti le cellule CD24+CD133+ persistano come cellule epiteliali parietali localizzate al polo urinifero della capsula di Bowman, avvalorando l'ipotesi che, le cellule CD24+CD133+ evidenziate nel rene umano adulto⁵, rappresentino una sottopopolazione di progenitori embrionali preservati fin dalle prime fasi della nefrogenesi.

Quindi, il polo urinifero della capsula di Bowman potrebbe rappresentare la nicchia staminale del rene, poiché è il sito privilegiato specifico in cui le SC risiedono¹¹⁶. In accordo con la nostra ipotesi, le cellule staminali embrionali, una volta differenziate a cellule tubulari renali, migrano selettivamente alla giunzione tubulo-glomerulare dopo l'inoculo nel rene in via di formazione¹¹⁶. Comunque, poiché il mesenchima metanefrico dà origine prevalentemente alla porzione corticale del rene, mentre la maggior parte della midollare deriva dalla gemma ureterale, il rene potrebbe anche contenere due nicchie staminali. Infatti, altri autori hanno suggerito l'esistenza di una nicchia di SC nella papilla renale^{117,118}.

Inoltre, è interessante notare che le CD24+CD133+REC erano in grado di impiantarsi nel rene di topi SCID affetti da insufficienza renale acuta indotta dal glicerolo e di migliorare la funzione renale. Nei reni danneggiati le CD24+CD133+REC rigeneravano prevalentemente il tubulo prossimale, il tubulo distale ed il dotto collettore, ma sebbene a bassa frequenza, esse erano in grado di impiantarsi anche in strutture vascolari, in accordo con la loro natura di progenitori multipotenti. La bassa frequenza di impianto nei vasi è probabilmente legata al fatto che in un modello di IRA indotta da rabdomiolisi, i tubuli renali, in particolare, nel segmento prossimale, rappresentino il bersaglio preferenziale del danno tossico. Inoltre, l'inoculo precoce di CD24+CD133+REC preveniva in

modo significativo il declino della funzione renale, fornendo una più rapida riparazione dei tessuti tubulari necrotici. Comunque, deve essere presa in considerazione la possibilità che la riduzione del danno e della cicatrice interstiziale nelle aree del rene che incorporano le SC somministrate, sia da correlare anche ad un effetto paracrino delle cellule inoculate.

Considerati nel loro complesso, i risultati di questo studio forniscono il primo esempio di terapia cellulare del danno renale, utilizzando una popolazione selezionata di cellule progenitrici renali embrionali. Questi risultati suggeriscono inoltre che le cellule CD24+CD133+ mostrano capacità staminali indipendentemente dalla loro origine embrionale o adulta. Comunque, a seguito dell'infusione di CD24+CD133+REC in topi SCID affetti da insufficienza renale acuta, circa il 15% delle cellule tubulari derivavano dalle cellule del donatore, mentre dopo l'inoculo di cellule CD24+CD133+ adulte soltanto il 6% circa delle cellule tubulari era di origine umana⁵, suggerendo che le CD24+CD133+REC abbiano una potenzialità sostanzialmente più elevata di impianto e rigenerazione tissutale rispetto alle CD24+CD133+APEMP. È importante sottolineare che, nonostante il loro elevato potenziale rigenerativo, le CD24+CD133+REC qui descritte apparentemente non hanno mostrato alcun potenziale teratogeno *in vivo*. Quindi, l'abilità delle CD24+CD133+REC di riparare il danno renale, insieme con la loro apparente incapacità di formare tumori *in vivo*, avvalorano l'ipotesi di una loro effettiva potenzialità per il trattamento delle nefropatie.

BIBLIOGRAFIA

1. Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*, 365:331-40, 2005.
2. Ali T, Khan I, Simpson W, et al. Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study. *J Am Soc Nephrol*, 18:1292-8, 2007.
3. Little MH. Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 17:2390-2401, 2007.
4. Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Imberti B. The regenerative potential of stem cells in acute renal failure. *Cell Transplant*, 1:S111-7, 2006.
5. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol*, 17:2443-2456, 2006.
6. Dekel B, Reisner Y. Embryonic committed stem cells as a solution to kidney donor shortage. *Expert Opin Biol Ther*, 4:443-454, 2004.
7. Yamamoto M, Cui L, Johkura K, et al. Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290:F52-60, 2006.
8. Kolossov E, Bostani T, Roell W, et al. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med*, 203:2315-2327, 2006.
9. Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol*, 197:419-423, 2002.
10. Melton DA, Cowan C. Stemness: Definitions, Criteria, and Standards. *Handbook of Stem Cells*, [editor Lanza, R.]; Vol 2, XXI-XXVIII, 2004.

11. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17: 387-403, 2001.
12. Papaioannou V. Stem cells and Differentiation. *Differentiation*, 8:153-154, 2001.
13. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, et al. A stem cell molecular signature. *Science*, 298:601-604, 2002.
14. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:435-462, 2001.
15. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282:1145-1147, 1998.
16. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, et al. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*, 282:2072-2075, 1998.
17. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70:841-847, 1992.
18. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, et al. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 359:482-483, 1992
19. Verfaillie CM. Adult stem cells: Tissue specific or not? *Handbook of Stem Cells*, [editor Lanza, R.]; Vol 2, 13-17, 2004.
20. Rizvi AZ, Wong MH. Epithelial stem cells and their niche: there's no place like home. *Stem Cells*, 23:150-165, 2005.
21. Anglani F, Forino M, Del Prete D, et al. In search of adult renal stem cells. *J Cell Mol Med*, 8:474-487, 2004.
22. Dressler GR. The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22:509-529, 2006.
23. Yosipiv IV and Dahr SS. Role of the renin-angiotensin system in the development of the ureteric bud and renal collecting system. *Pediatr Nephrol*, 20:1219-1229, 2005.
24. Dekel B and Reisner Y. Engraftment of human early kidney precursors. *Transplant Immunology*, 12: 241-247, 2008.

25. Herzlinger D. Renal stem cells and the lineage of the nephron. *Annu Rev Physiol*, 56:671-689, 1994.
26. Horster MF, Braun GS, Huber SM. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev*, 79:1157-1191, 1999.
27. Nyengaard JR and Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec*, 232:194-201, 1992.
28. Al-Awqati Q and Goldberg MR. Architectural patterns in branching morphogenesis in the kidney. *Kidney Int*, 54:1832-1842, 1998.
29. Moritz KM, Dodic M and Wintour EM. Kidney development and the fetal programming of adult disease. *BioEssays*, 25:212-220, 2003.
30. Grobstein C. Inductive epithelio-mesenchymal interaction in cultured organ rudiments of the mouse. *Science*, 118:52-55, 1953.
31. Gruenwald P. Development of the excretory system. *Ann N Y Acad Sci*, 55:142-146, 1952.
32. Qiao J, Cohen D, Herzlinger D. The metanephric blastema differentiates into collecting system and nephron epithelia in vitro. *Development*, 121:3207-3214, 1995.
33. Schedl A, Hastie ND. Cross talk in kidney development. *Curr Opin Genet & Develop*, 10:543-549, 2000.
34. Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, et al. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature*, 381:789-793, 1999.
35. Moore MW, Klein RD, Farinas I, et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, 382:76-79, 1996.
36. Xu PX, Adams J, Peters H, et al. Eya-1 deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet*, 23:113-117, 1999.
37. Donovan MJ, Natoli TA, Sainio K, et al. Initial differentiation of the metanephric mesenchyme is independent of WT1 and the ureteric bud. *Dev Genet*, 24:252-262, 1999.
38. Barasch J, Yang J, Ware CB, et al. Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. *Cell*, 99:377-386, 1999.

39. Barasch J, Qiao J, McWilliams G, et al. Ureteric bud cells secrete multiple factors, including bFGF, which rescue renal progenitors from apoptosis. *Am J Physiol*, 273:F757-F767, 1997.
40. Kispert A, Vainio S, Shen L, et al. Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips. *Development*, 122:3627-3637, 1996.
41. Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, et al. Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development*, 124:1653-1664, 1997.
42. Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RS, Wilson VA. Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulphate 2-sulfotransferase. *Genes Dev*, 12:1894-1906, 1998.
43. Rothenpieler UW, Dressler GR. Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development. *Development*, 119:711-720, 1993.
44. Dehbi M, Ghahremani M, Lechner M, et al. The paired-box transcription factor PAX2, positively modulates expression of the Wilms tumor suppressor gene (Wt1). *Oncogene*, 13:447-453, 1996.
45. Ryan G, Steele Perkins V, Morris JF, et al. Repression of Pax2 by Wt1 during normal kidney development. *Development*, 121:867-875, 1995.
46. Godin RE, Takaesu NT, et al. Regulation of Bmp7 expression during kidney development. *Development*, 125:3473-3482, 1998.
47. Dudley AT, Godin RE, Robertson EJ. Interaction between FGF and BMP signalling pathways regulates development of metanephric mesenchyme. *Genes Dev*, 13:1601-1613, 1999.
48. Hatini V, Huh SO, Herzlinger D, et al. Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev*, 10:1467-1478, 1996.
49. Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogeneous genetic response among

- nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J. Clin Invest*, 93:2175-2188, 1994.
50. Oliver JA. Adult renal stem cells and renal repair. *Curr Opin Nephrol Hypert*, 13:17-22, 2004.
 51. Brodie JC, Humes HD. Stem cell approaches for the treatment of renal failure. *Pharmacol Rev*, 57:299-313, 2005.
 52. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int*, 59:2023-2038, 2001.
 53. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*, 110:341-350, 2002.
 54. Cantley LG. Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule. *Nat Clin Pract Nephrol*, 1:22-32, 2005.
 55. Schena FP. Role of growth factors in acute renal failure. *Kidney Int Sup*, 66:11-15, 1998.
 56. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 13:96-107, 2002.
 57. Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol*, 195:229-235, 2001.
 58. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, et al. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int*, 62:1285-1290, 2002.
 59. Lin F, Cordes K, Li L, et al. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol*, 14:1188-1199, 2003.
 60. Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 15:1794-1804, 2004.
 61. Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest*, 115:1756-1764, 2005.

62. Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*, 115:1743-1755, 2005.
63. Kunter U, Rong S, Boor P, et al. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *J Am Soc Nephrol*, 18:1754-64, 2007.
64. Zhang Y, Woodward VK, Shelton JM, et al. Ischemia-riperfusion induces G-CSF gene expression by renal medullary thick ascending limb cells *in vivo* and *in vitro*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286:1193-1201, 2004.
65. Togel F, Isaac J, Hu Z, et al. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. *Kidney Int*, 67:1772-1784, 2005.
66. Iwasaki M, Adachi Y, Minamino K, et al. Mobilization of bone marrow cells by G-CSF rescues mice from cisplatin-induced renal failure and M-CSF enhances the effects of G-CSF. *J Am Soc Nephrol*, 16:658-666, 2005.
67. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, et al. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med*, 14:1035-1041, 2004.
68. Togel F, Hu Z, Weiss K, et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289:31-42, 2005.
69. Bi B, Schmitt R, Israilova M, et al. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *J Am Soc Nephrol*, 18:2486-2496, 2007.
70. Togel F, Isaac J, Westenfelder C. Hematopoietic stem cell mobilization-associated granulocytosis severely worsens acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 15:1261-7, 2004.
71. Stokman G, Leemans JC, Claessen N, et al. Hematopoietic stem cell mobilization therapy accelerates recovery of renal function independent of stem cell contribution. *J Am Soc Nephrol*, 16:1684-92, 2005.
72. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418:41-49, 2002.

73. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143–147, 1999.
74. Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, et al. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100[Suppl 1]: 11854–11860, 2003.
75. Cho KJ, Trzaska KA, Greco SJ, et al. Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha. *Stem Cells*, 23:383–391, 2005.
76. Singri N, Ahya SN, Levin ML. Acute renal failure. *JAMA*, 289:747-751, 2003.
77. Metcalfe W, Simpson M, Khan IH, et al. Scottish Renal Registry. Acute renal failure requiring renal replacement therapy: incidence and outcome. *QJM*, 95:579-583, 2002.
78. Brady HR, Brenner BM. Insufficienza renale acuta. *Harrison, Principi di Medicina Interna 15a ed*, 2:1794-1804, 2002.
79. Gill N, Nally JV Jr, Fatica RA. Renal failure secondary to Acute Tubular Necrosis: epidemiology, diagnosis, and management. *Chest*, 128:2847-2863, 2005.
80. Rugarli C. Medicina interna sistematica. *Ed Masson IV edizione*, 2002.
81. Conger JD. Vascular alterations in the acute renal failure: roles in initiation and maintenance. *Acute renal failure, a companion to Brenner and Rector's the kidney, 1st edn*, 13-29, 2001.
82. Dagher PC. Apoptosis in ischemic renal injury: roles of GTP depletion and p53. *Kidney Int*, 66:506-509, 2004.
83. Kaushal GP, Basnakian AG, Shah SV. Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*, 66:500-506, 2004.
84. Molitoris BA. Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*, 66:871-883, 2004.
85. Gailit J, Colflesh D, Rabiner I, et al. Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress. *Am J Physiol*, 264:149-157, 1993.

86. Romanov V, Noiri E, Czerwinski G, et al. Two novel probes reveal tubular and vascular Arg-Gly-Asp (RGD) binding sites in the ischemic rat kidney. *Kidney Int*, 52:93-102, 1997.
87. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med*, 109:655-678, 2000.
88. Paller MS, Hedlund BE. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. *Kidney Int*, 34:474-80, 1988.
89. Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, et al. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest*, 100:439-48, 1997.
90. Bayati A, Hellberg O, Odling B, Wolgast M. Prevention of ischaemic acute renal failure with superoxide dismutase and sucrose. *Acta Physiol Scand*, 130:367-372, 1987.
91. Ogawa T, Mimura Y. Antioxidant effect of zinc on acute renal failure induced by ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Nephrol*, 19:609-14, 1999.
92. Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, et al. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int*, 58:658-673, 2000.
93. Kim SY, Kim CH, Yoo HJ, Kim YK. Effects of radical scavengers and antioxidants on ischemic acute renal failure in rabbits. *Ren Fail*, 21:1-11, 1999.
94. Zager RA, Fuerstenberg SM, Baehr PH, et al. An evaluation of antioxidant effects on recovery from postischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 4:1588-1597, 1994.
95. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int*, 66: 480-485, 2004.
96. Kaushal GP, Portilla D, Price PM, et al. Cellular mechanisms of nephrotoxicity. *Clinical nephrotoxin*, 2: 65-76, 2001.

97. Wangsiripaisan A, Gengaro PE, Edelstein CL, Schrier RW. Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions. *Kidney Int*, 59:932-940, 2001.
98. Price PM, Megyesi J, Safirstein RL. Cell cycle regulation: repair and regeneration in acute renal failure. *Kidney Int*, 66:509-514, 2004.
99. Coimbra TM, Cieslinski DA, Humes HD. Epidermal growth factor accelerates renal repair in mercuric chloride nephrotoxicity. *Am J Physiol*, 259:438-443, 1990.
100. Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:11876-80, 1992.
101. Hirschberg R, Kopple J, Lipsett P, et al. Multicenter clinical trial of recombinant human insulin-like growth factor I in patients with acute renal failure. *Kidney Int*, 55:2423-2432, 1999.
102. Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, et al. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest*, 107:53-63, 2001.
103. Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, et al. CD14+CD34^{low} cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res*, 97:314-322, 2005.
104. Zager RA. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int*, 49:314-326, 1996.
105. Zager RA, Andoh T, Bennett WM. Renal cholesterol accumulation: A durable response after acute and subacute renal insults. *Am J Pathol*, 159:743-752, 2001.
106. Temple S. The development of neural stem cells. *Nature*, 414:112-117, 2001.
107. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441:1068-1074, 2006.
108. Boiani M, Scholer HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:872-884, 2005.

109. Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest*, 113:175-179, 2004.
110. Oliver JA, Barasch J, Yang J, et al. Metanephric mesenchyme contains embryonic renal stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283:F799-809, 2002.
111. Herzlinger D, Koseki C, Mikawa T, Al-Awqati Q. Metanephric mesenchyme contains multipotent stem cells whose fate is restricted after induction. *Development*, 114:565-572, 1992.
112. Risau W. Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int Suppl*, 67:S3-6, 1998.
113. Reilly RF, Ellison DH. Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev*, 80:277-313, 2000.
114. Dekel B, Burakova T, Arditti FD, et al. Human and porcine early kidney precursors as a new source for transplantation. *Nat Med*, 9:53-60, 2003.
115. Scadden DT. The stem -cell niche as an entity of action. *Nature*, 441:1075-1079, 2006.
116. Kim D, Dressler GR. Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. *J Am Soc Nephrol*, 16:3527-3534, 2005.
117. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, et al. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest*, 114:795-804, 2004.
118. Dekel B, Zangi L, Shezen E, et al. Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin- multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. *J Am Soc Nephrol*, 17:3300-3314, 2006.